

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

***In vitro* Testung des Varizella-Zoster Virus als
onkolytisches Virus in der Glioblastomtherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Henning Leske

aus Dessau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

PD Dr. Niklas Thon

Mitberichterstatter:

PD Dr. Konrad Trülzsch

PD Dr. Andreas Moosmann

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Armin Baiker

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

07.11.2019

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Einleitung	13
1.1 Hirntumore	13
1.1.1 Geschichte	13
1.1.2 Klassifikation der Hirntumore	14
1.1.3 Histologie astrozytärer Tumore.....	16
1.1.3.1 Einführung	16
1.1.3.2 Pilozytisches Astrozytom (WHO Grad I)	17
1.1.3.3 Subependymales Riesenzellastrozytom (WHO Grad I)	18
1.1.3.4 Pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO Grad II)	19
1.1.3.5 Diffuses Astrozytom (WHO Grad II).....	20
1.1.3.6 Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III).....	21
1.1.3.7 Gliosarkom (WHO Grad IV).....	22
1.1.3.8 Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV)	23
1.1.4 Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) allgemein.....	24
1.1.4.1 Genetik Glioblastom	25
1.1.4.1.1 O6-Methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT).....	26
1.1.4.1.2 CD133 als diskutierter Glioblastom - assoziierter Marker	27
1.1.4.1.3 ASPM (abnormal spindle like microcephaly associated protein)	27
1.1.4.2 Therapie.....	28
1.1.4.2.1 Standardtherapien	28
1.1.4.2.2 Nicht - Standardtherapien.....	29
1.2 Onkolytische Viren	30
1.2.1 Geschichte	30
1.2.2 Therapeutischer Ansatz.....	31
1.2.3 Klinisch getestete Viren in der GBM Therapie	31
1.2.3.1 Adenovirus - ONYX 015 (CI-1042 bzw. H101)	32
1.2.3.2 Herpes simplex Virus 1 (HSV1)	33
1.2.3.3 Reovirus	35
1.2.3.4 Newcastle Disease Virus	35
1.2.4 Weitere experimentell getestete onkolytische Viren in der GBM Therapie	36
1.2.4.1 Poliovirus	36
1.2.4.2 Masernvirus	36
1.2.4.3 Parvovirus	37
1.2.4.4 Vesikuläres Stomatitis Virus	38
1.2.4.5 Varizella Zoster Virus	38
1.3 Ziel der Arbeit.....	40
2 Material und Methoden.....	41
2.1 Zellbiologische Methoden.....	41

2.1.1	Allgemeine Zellkultur.....	41
2.1.1.1	Splitten von Zellen.....	42
2.1.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	42
2.1.1.3	Bestimmung der Zellzahl	42
2.1.2	Primärkultur	43
2.1.3	Magnetic bead sorting (Magnetic activated cell sorting (MACS)).....	43
2.1.4	Markieren von Zellen mit Dil.....	44
2.1.5	Zellsphäroid	44
2.1.5.1	Sphäroid Design.....	44
2.1.5.1.1	Agar noble Methode	44
2.1.5.1.2	Hängender Tropfen Methode	45
2.1.5.2	Einbetten	45
2.1.5.3	Schneiden	45
2.1.6	Konfrontationsassay.....	45
2.1.7	VZV Infektion <i>in vitro</i>	46
2.1.7.1	Hintergrund der verwendeten Viren	46
2.1.7.2	Ermittlung der Plaque Forming Units	47
2.1.7.3	Replikationsgeschwindigkeitsanalyse.....	47
2.1.8	Immunzytochemie.....	47
2.1.8.1	Varizella Zoster Virus Färbung.....	48
2.1.8.2	CD133 und ASPM Färbung.....	48
2.2	Westernblot	49
2.2.1	Protein Separation und Blot	49
2.2.2	Signaldetektion.....	49
3	Ergebnisteil.....	50
3.1	Generierung von Primärkulturen.....	50
3.2	VZV Replikation in Gliomzelllinien und Primärkulturen	51
3.2.1	Zellshuttle für VZV Infektionen.....	51
3.2.1.1	Virustiterbestimmung.....	52
3.2.1.2	Zytolyseexperiment der Zellshuttle MRC5 und hMSCs nach wt pOKA VZV Infektion	53
3.2.2	Morphologische Unterschiede zwischen verschiedenen mit wt pOKA VZV infizierten Zellkulturen.....	54
3.3	Bestimmung der Aciclovir Konzentration zur Hemmung der Varizella Zoster Replikation ..	55
3.4	Vergleich des Replikationsverhaltens von wt pOKA zwischen den Zellkulturen.....	57
3.5	Virusmutanten Experiment	58
3.5.1	Replikationsgeschwindigkeitsanalyse	58
3.5.2	Expression viraler Proteine.....	59
3.6	Virusreplikation im dreidimensionalen Modell	60
3.6.1	hMSC als Gliom attraktiertes Zellshuttle.....	62
3.6.1.1	VZV Infektion von hMSC Sphäroiden.....	63
3.6.1.2	Konfrontationsassay	64
3.7	Tumorspezifische Marker.....	66
4	Diskussion.....	69
4.1	VZV infiziert Primärkulturen und Zelllinien maligner Gliomgewebe	70
4.2	VZV infiziert Zellen im 3D Modell	70
4.3	VZV Mutante	72

4.4	Humane mesenchymale Stammzellen als Carrier für VZV	74
4.5	hMSCs als Gliom unterstützende Zellen?	75
4.6	CD133 als Tumorstammzellmarker?	76
4.7	Experimente mit Tierversuchen.....	77
4.8	ASPM als glioblastomspezifischer Marker?	78
4.9	Möglicher therapeutischer Ansatz.....	79
5	Zusammenfassung	81
6	Referenzen	83
7	Abbildungsverzeichnis.....	95
8	Tabellenverzeichnis.....	97
9	Danksagung	98
10	Lebenslauf.....	99
11	Eidesstattliche Versicherung	100

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Adenomatous-polyposis-coli
Aqua Dest.	aqua destillata, destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ASPM	abnormal spindle like protein microcephaly associated
AT/RT	Atypischer teratoider/ rhabdoider Tumor
bp	Basenpaare
BRAF	Serin/Threonin – Protein Kinase B-RAF
Bzw.	beziehungsweise
CCNU	Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dil	DiI _{C18} (3) – Indocarbocyanid Farbstoff
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
ds	Doppelsträngig

E	Early
EDTA	Ethylendiamintetra-Essigsäure
EGFR	Epithelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
eIF2 α	Eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
FC Teil	Teil des Antikörpers (fragment cristallizable)
FCS	Fetales Rinderserum
γ 34.5	Genabschnitt für Neurovirulenz
g	Gramm
GBM	Glioblastoma multiforme (Glioblastom)
gCIMP	Gliom spezifischer CpG island Methylator Phänotyp
GFAP	Gliafaserprotein
Gy	Gray (Einheit für Bestrahlung)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HHV	Humanes Herpesvirus
hMLH1	Humanes MutL homolog 1 → DNA Mismatch Reparaturprotein
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
hPMS2	Humane Mismatch Reparatarendonuklease
HSV	Herpes simplex Virus
ICP	Infected cell protein
IDE	Insulin Degradierungs Enzym
IDH	Isocitratdehydrogenase
IE	Immediate early
IL	Interleukin

IR	Interne Sequenzwiederholungen
IRES	Internal ribosomal entry site
Kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
L	Late
lg	Dekadischer Logarithmus
lacZ	Gen, welches bei Escherichia coli für die β -Galaktosidase codiert
MACS	Magnetic activated cell sorting
MeWo	Melanomzelllinie
MGMT	O6-Methylguanin DNA Methyltransferase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
M	Molar (1Molar entspricht 1 mol/l)
mM	Milli Molar
mol	1 mol ist die Stoffmenge welche ca 6.022×10^{23} Teilchen entspricht
μg	Mikrogramm 1/1000.000 Gramm
μl	Mikroliter
mock	Negativkontrolle, Behandlung ohne wirksames Agens
MRC5	Fibroblastenzelllinie
NaCl	Kochsalz
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat

NDV	Newcastles disease Virus
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NP-40	Nonoxinol 40 (Nonylphenol-Derivat mit Polyethylenglycol Seitenkette)
ORF	Open reading frame
ori	Origin of replication
P	Plaqueformation
p53	Komplexer intrazellulärer Kontrollmechanismus, Wächter des Genoms
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFU	Plaque Forming Units
pH	dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PKR	Proteinkinase R
PML-NB	Promyelozytisch - leukämische Kernkörperchen
pOKA	Parental OKA, Varizella Zoster Virus Stamm
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVS(RIPO)	onkolytisches Poliovirus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma (schnell bildendes Fibrosarkom)
RAS	Rat sarcoma, spezifische Signalkaskade

RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
rOKA	Rekombinantes OKA Varizella Zoster Virus
rRNA	Ribosomale RNA
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEGA	Subependymales Riesenzellastrozytom
SIM	SUMO interagierende Motive
ss	Einsträngig
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUMO	Small ubiquitin like modifier
Sy	Synzytienbildung
TB	Gewebebanknummer Neurochirurgie LMU
TB Puffer	Transfer Puffer
TBS	Tris buffered Saline
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TR	Terminale Sequenzwiederholungen
TTBS	TBS versetzt mit Tween
U	Umdrehungen
UL	Lange Region
US	Kurze Region
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vOKA	vakzinia OKA Virus (attenuierter Stamm)
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VZV	Varizella Zoster Virus

WHO	World Health Organization (Welt Gesundheits Organisation)
wt	Wildtyp

Einleitung

1.1 Hirntumore

1.1.1 Geschichte

Im Wintersemester 1862/63 prägte Rudolf Virchow (1821-1902) den Begriff des Glioms für Geschwülste „welche eine nähere, histologische und genetische Bedeutung zum Nervensystem haben, ohne doch nervös zu sein“. Das Gliom stellt eine Neoplasie dar, welche sich von den Stützzellen des Zentralen Nervensystems, den sogenannten Gliazellen (Glia griechisch für Leim), ableitet. Dieser Begriff erfreute sich Ende des 19. Jahrhunderts allgemeiner Beliebtheit und wurde rasch in den medizinischen Kontext mit aufgenommen. Die maligne Form des Glioms stellt das Glioblastoma multiforme dar.

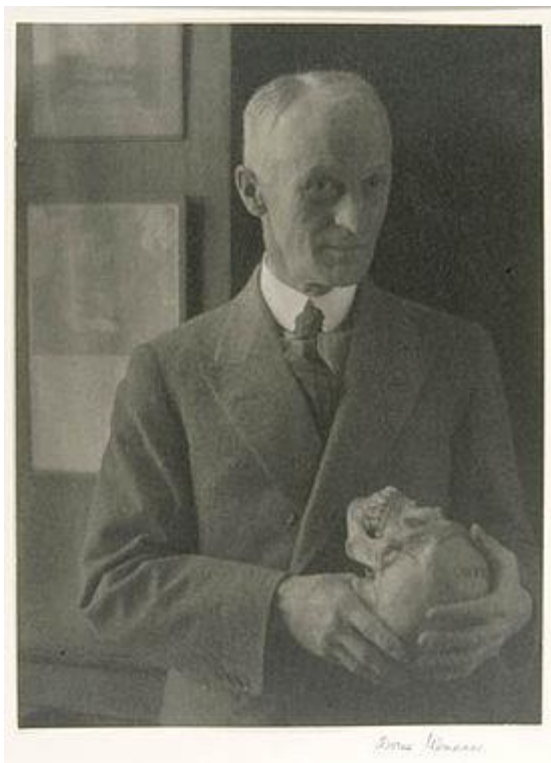


Abb. 1: Prof. Harvey Cushing (Quelle: Wikipedia)

Der Begriff Glioblastoma multiforme wurde von Percival Bailey (Neuropathologe/ Neurochirurg) und Harvey Cushing (Neurochirurg) im Jahre 1926 geprägt (Abb. 1). Die beiden nahmen an, dass der Tumor

von glialen Vorläuferzellen (Glioblasten) ausgeht und morphologisch sehr variabel sein kann (multiforme). Es zeigte sich, mitunter auch auf die Beobachtungen von dem Neurochirurgen Dr. Walter Dandy gestützt, dass diese Art von Tumor durch ein ausgeprägtes infiltratives Wachstum gekennzeichnet ist. Dieser operierte in den 1920er Jahren komatöse Patienten, die ein Glioblastom (GBM) hatten, derart, dass er die komplette betroffene Hirnhälfte entfernte (Dandy 1928). Dennoch entwickelte sich teilweise wenig später auf der Gegenseite ebenfalls ein Glioblastom, an dem die Patienten letztendlich verstarben.

Trotz dieses ernüchternden Ergebnisses wiesen die Beobachtungen von Cushing und Bailey jedoch darauf hin, dass viele Patienten mit einem Gliom auch von einer inkompletten Tumorentfernung profitierten und ein längeres Überleben zeigten. Darüber hinaus gelang es ihnen, auch basierend auf histomorphologischen Unterschieden, die bis dato über 400 von Cushing operierten Gliome in 13 verschiedene Subtypen einzuteilen, welche mit der Prognose der Patienten korrelierten.

Die „Histologische Ära“ der Gliomforschung war geboren. Diese Einteilung stellt die Grundlage der heutigen neurochirurgischen und neuroonkologischen Behandlung sowie der Forschung dar.

1.1.2 Klassifikation der Hirntumore

Als Hirntumore werden Geschwülste bezeichnet, welche sich innerhalb des Hirnparenchyms befinden. Man kann diesen Begriff weiter einteilen in primäre und sekundäre Hirntumore. Primäre Hirntumore sind, gleichbedeutend den neuroepithelialen Tumoren, Neoplasien, welche sich auf dem Boden hirneigener Zellen (*de novo*) entwickeln.

Zelltyp	Tumortyp	WHO Gradierung
astrozytär	pilozytisches Astrozytom	I
	subependymales Riesenzellastrozytom	I
	pilomyxoides Astrozytom	II
	diffuses Astrozytom	II
	pleomorphes Xanthoastrozytom	II
	chordoides Gliom des dritten Ventrikels	II-III
	anaplastisches Astrozytom	III
	Glioblastoma multiforme	IV

	Gliosarkom	IV
oligodendrogial	Oligodendrogliom	II
	anaplastisches Oligodendrogliom	III
Mischgliome	Oligoastrozytom	II
	anaplastisches Oligoastrozytom	III
ependymal	Subependymom	I
	myxopapilläres Ependymom	I
	Ependymom	II
	anaplastisches Ependymom	III
neuronal und gemischt-neuronal	Gangliozytom	I
	dysplastisches Gangliozytom des Kleinhirns	I
	desmoplastisch infantiles Astrozytom	I
	desmoplastisch infantiles Gangliogliom	I
	Gangliogliom	I
	anaplastisches Gangliogliom	III
	Neurozytom	II
	cerebelläres Liponeurozytom	II
	rosettenformender glioneuronaler Tumor des vierten Ventrikels	II
	papillärer glioneuronaler Tumor	I
Pinealistumore	Pineozytom	I
	papillärer Tumor der Pinealisregion	II
	Pinealisparenchymtumor intermediärer Differenzierung	II
	Pineoblastom	IV
embryonale Tumore	Medulloblastom	IV
	primitiv neuroektodermaler Tumor (PNET)	IV
	atypischer teratoider/rhabdoider Tumor (AT/RT)	IV
Plexus-Choroideus Tumore	Plexuspapillom	I
	atypisches Plexuspapillom	II
	Plexuskarzinom	IV

Tab.1 Primäre Hirntumore (entsprechend der Klassifikation der Hirntumore nach WHO 2007)

Daneben gibt es meningotheliale Tumore, mesenchymale Tumore, Keimzelltumore, melanozytäre Tumore und Tumore der Sellaregion. Sekundäre Hirntumore sind Neoplasien, welche nicht ihren Ursprung in Strukturen des zentralen Nervensystems haben. Dazu gehören unter anderem Metastasen der Karzinome, Sarkome und Tumore des hämatopoetischen Systems.

Die Klassifikation der Hirntumore wird entsprechend der World Health Organization (WHO) of the Central Nervous System (CNS) (Louis et al. 2007) vorgenommen und basiert entitätsabhängig auf dem Therapieansprechen bzw. der therapiefreien Prognose der Patienten. Dabei haben in der Regel Patienten mit einem WHO Grad I Hirntumor eine bessere Prognose als Patienten mit einem WHO Grad IV Tumor (höchster Tumorgrad).

In dieser Arbeit liegt der Hauptfokus auf den Astrozytomen, welche im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.1.3 Histologie astrozytärer Tumore

1.1.3.1 Einführung

Astrozytome sind die häufigsten primären Hirntumore des Menschen. Prognostisch kann man sie in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören das pilozytische Astrozytom, das subependymale Riesenzellastrozytom sowie das pleomorphe Xanthoastrozytom. Diese Tumore zeigen ein eher abgegrenztes, nicht infiltratives Wachstumsverhalten und können durch eine vollständige Exstirpation kurativ behandelt werden. Demgegenüber stehen die diffus infiltrierenden Gliome, wie das diffuse Astrozytom (WHO Grad II), das anaplastische Astrozytom (WHO Grad III), sowie das Glioblastom und dessen Variante das Gliosarkom (WHO Grad IV). Für diese Tumore gibt es bisher keinen kurativen Behandlungsansatz.

1.1.3.2 Pilozytisches Astrozytom (WHO Grad I)

Das pilozytische Astrozytom ist ein Tumor, welcher häufig beim Kind auftritt und typischerweise im Bereich des Cerebellums in Form einer Zyste mit einem Knoten zu finden ist. Histologisch ist dieser Tumor charakterisiert durch ein biphasisches Wachstum und Zellen mit langen, haarähnlichen (piloiden) Fortsätzen (Abb. 2). Die Kerne sind in der Regel eher monomorph und es finden sich im Allgemeinen nur wenige Mitosefiguren. Klassischerweise sind vermehrte Rosenthalfasern zu beobachten, welche in Form von deutlich eosinophilen und verbreiterten Fortsätzen imponieren. Daneben sind girlandenförmige Gefäße typisch.

Zur Bestätigung der Diagnose kann eine molekulargenetische Analyse durchgeführt werden, welche das Fusionsgen BRAF KIAA1549 untersucht und häufig beim kindlichen pilozytischen Astrozytom in der hinteren Schädelgrube positiv ist (Hasselblatt et al. 2011).

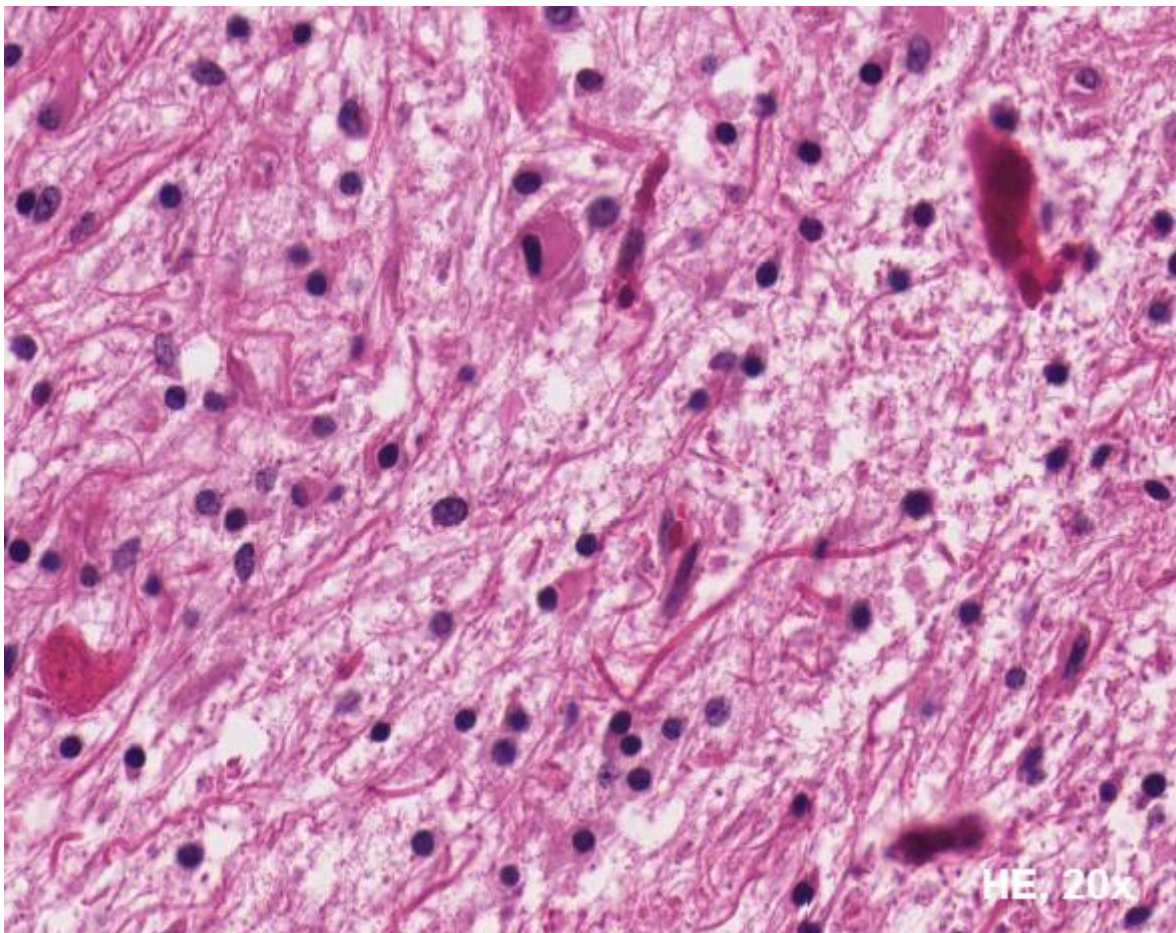


Abb. 2: Pilozytisches Astrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.3 Subependymales Riesenzellastrozytom (WHO Grad I)

Das subependymale Riesenzellastrozytom kommt in der Regel im Bereiche der Foramina Monroi vor, wo es durch Liquorabflussstörungen symptomatisch wird. Typischerweise sind von dieser Erkrankung Patienten mit einer tuberösen Hirnsklerose betroffen. Histologisch zeigen sich große, eosinophile und zytoplasmareiche Zellen (Abb. 3), welche eine variable Expression für das saure Gliafaserprotein (GFAP) zeigen und zum Teil positiv für neuronale Marker wie Synaptophysin oder Neurofilament sind.

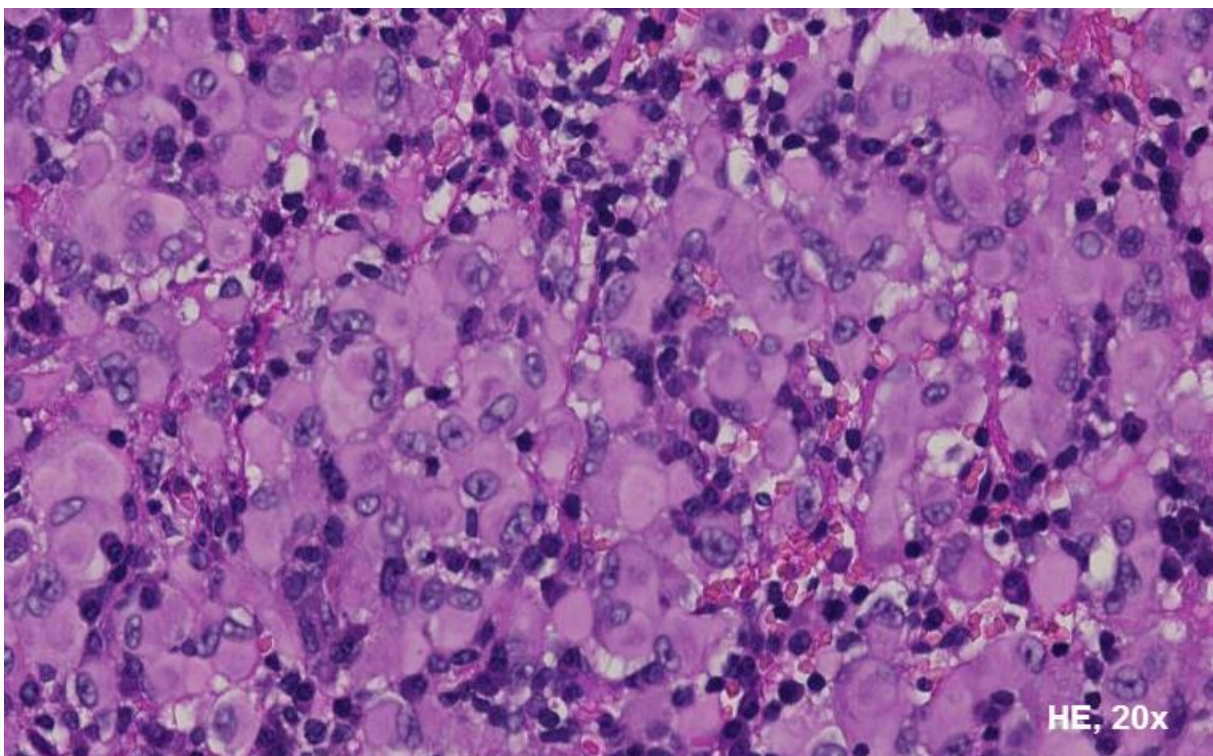


Abb. 3: Subependymales Riesenzellastrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.4 Pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO Grad II)

Das pleomorphe Xanthoastrozytom ist typischerweise oberflächlich und im Bereiche der Temporallappen lokalisiert. Radiographisch stellt es sich zumeist zystisch dar.

Histologische Merkmale dieser Entität sind ein pleomorphes Bild der Tumorzellen mit zum Teil sehr großen, teils multinukleären und unregelmäßig geformten Zellen (Abb. 4). Innerhalb des Zytoplasmas finden sich teilweise Lipideinlagerungen (xanthomatös), welche ebenfalls namensgebend sind für diese Neoplasie.

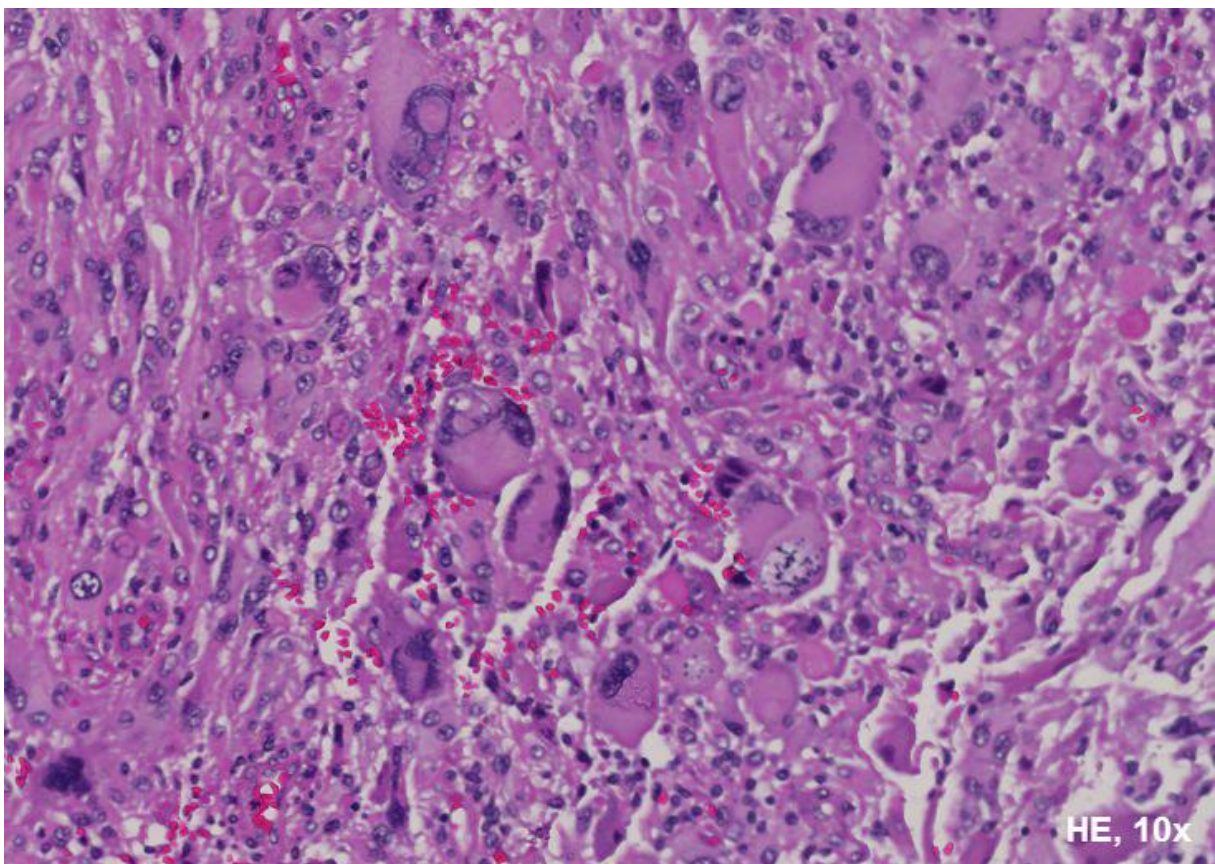


Abb. 4: Pleomorphes Xanthoastrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.5 Diffuses Astrozytom (WHO Grad II)

Das diffuse Astrozytom (WHO Grad II) ist, neben mikrozystischen Auflockerungen, charakterisiert durch dysmorphe astrozytäre Zellen, welche das Hirnparenchym diffus infiltrieren. Als weitere Untergruppen werden das protoplasmatische, das fibrilläre und das gemistozytische Astrozytom unterschieden. Nekrosen oder Gefäßproliferate fehlen und lediglich sehr vereinzelt Mitosefiguren sind zu erkennen (Abb. 5). Die Tumorzellen sind neben der Anfärbarkeit für GFAP, einem glialen Intermediärfilament Protein, häufig positiv für TP53- oder Isocitratdehydrogenase (IDH) - Mutationen.

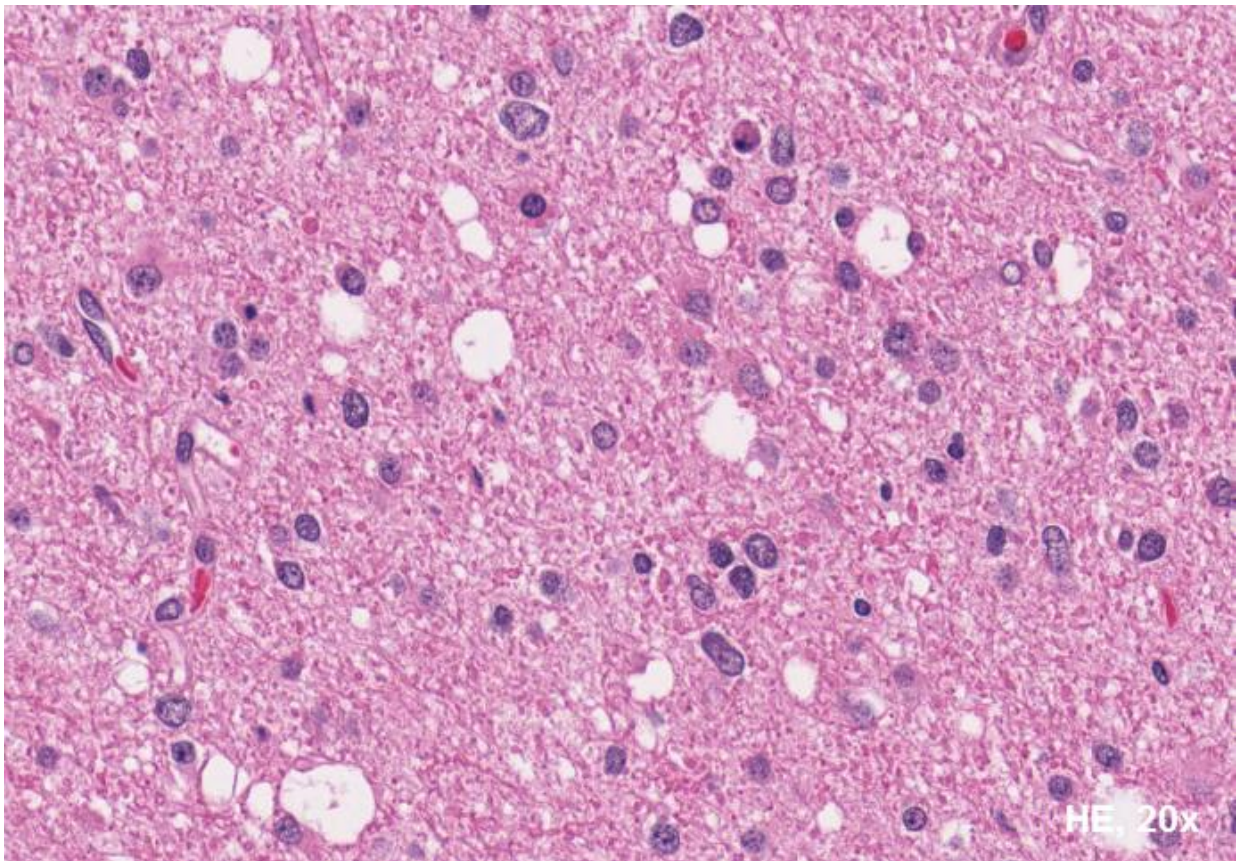


Abb. 5: Diffuses Astrozytom (WHO Grad II) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.6 Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III)

Das anaplastische Astrozytom ist dem diffusen Astrozytom (WHO Grad II) ähnlich, jedoch ist es in der Regel zellreicher (dies ist allerdings kein diagnostisches Kriterium) und zeigt eine gesteigerte Mitosefrequenz (Pfeil Abb. 6). Auch hier sind keine Nekrosen oder Gefäßproliferate zu finden.

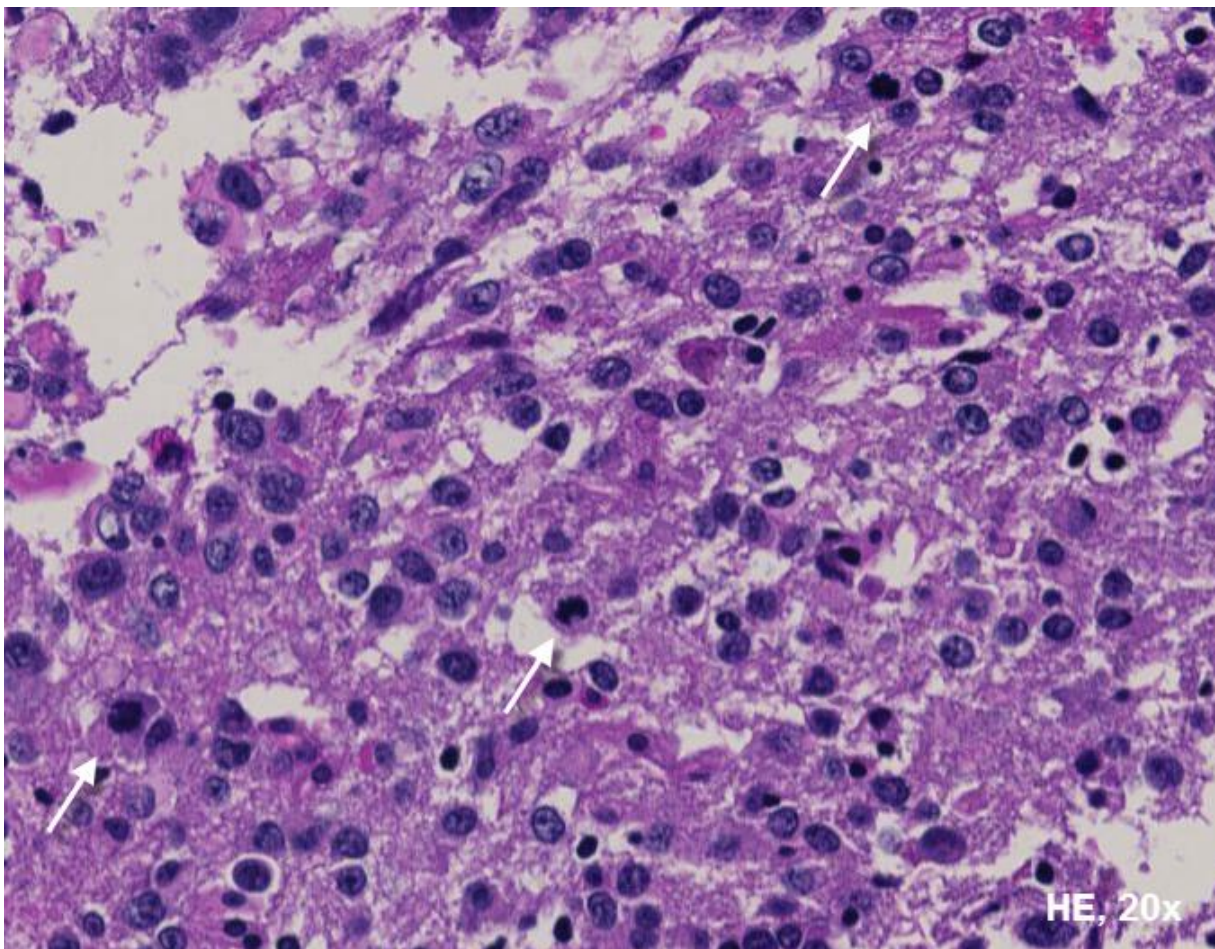


Abb. 6: Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.7 Gliosarkom (WHO Grad IV)

Das Gliosarkom ist eine Nebenform des Glioblastoma multiformes, welche ebenfalls Gefäßproliferate und/oder Nekrosen zeigt (Abb. 7). Typischerweise finden sich hier, neben GFAP - positiven astrozytären Arealen, GFAP - negative Komponenten, die ein eher zugförmiges Wachstumsmuster, entsprechend der Sarkome in anderen Organsystemen, zeigen.

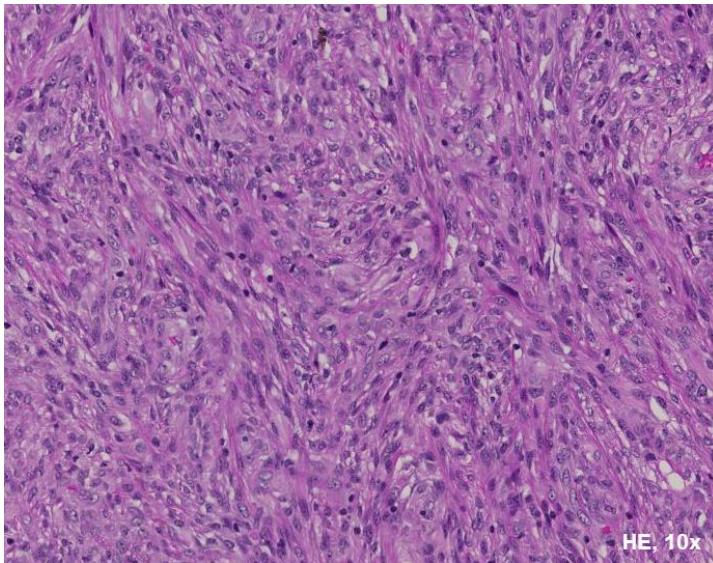


Abb. 7: Gliosarkom (WHO Grad IV) (HE) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

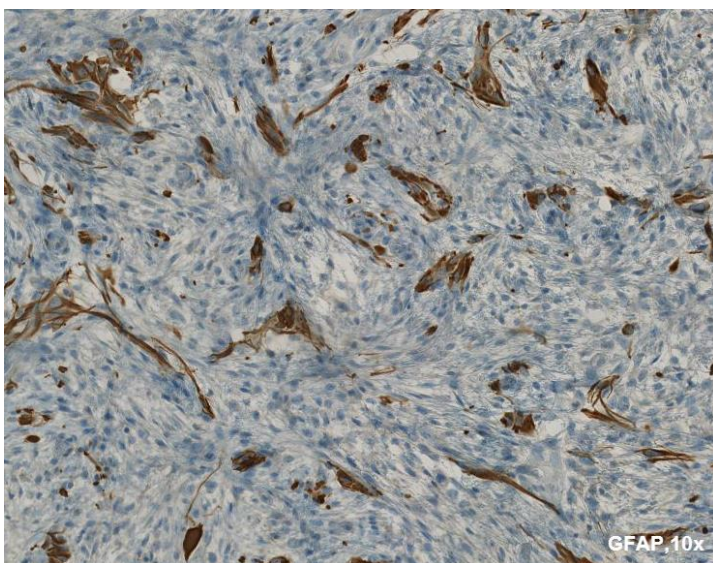


Abb. 8: Gliosarkom (WHO Grad IV) (GFAP) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.3.8 Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV)

Das Glioblastoma multiforme, welches heutzutage der Einfachheit halber nur als Glioblastom bezeichnet wird, ist ein Tumor mit prädominanter GFAP-positiver astrozytärer Komponente. Daneben werden als diagnostische Kriterien das Vorhandensein von Gefäßproliferaten bzw. strichförmige oder flächige Nekrosen zu Rate gezogen (Abb. 9).

Gerade bei bereits bestrahlten Patienten mit Tumorrezidiv kann die Einordnung schwierig sein, da hier eine gegebenenfalls iatrogen hervorgerufene morphologische Veränderung, in Form von verdickten Gefäßwänden oder Nekrosen, nicht zur eventuellen Aufgradierung der Tumorentität herangezogen werden darf.

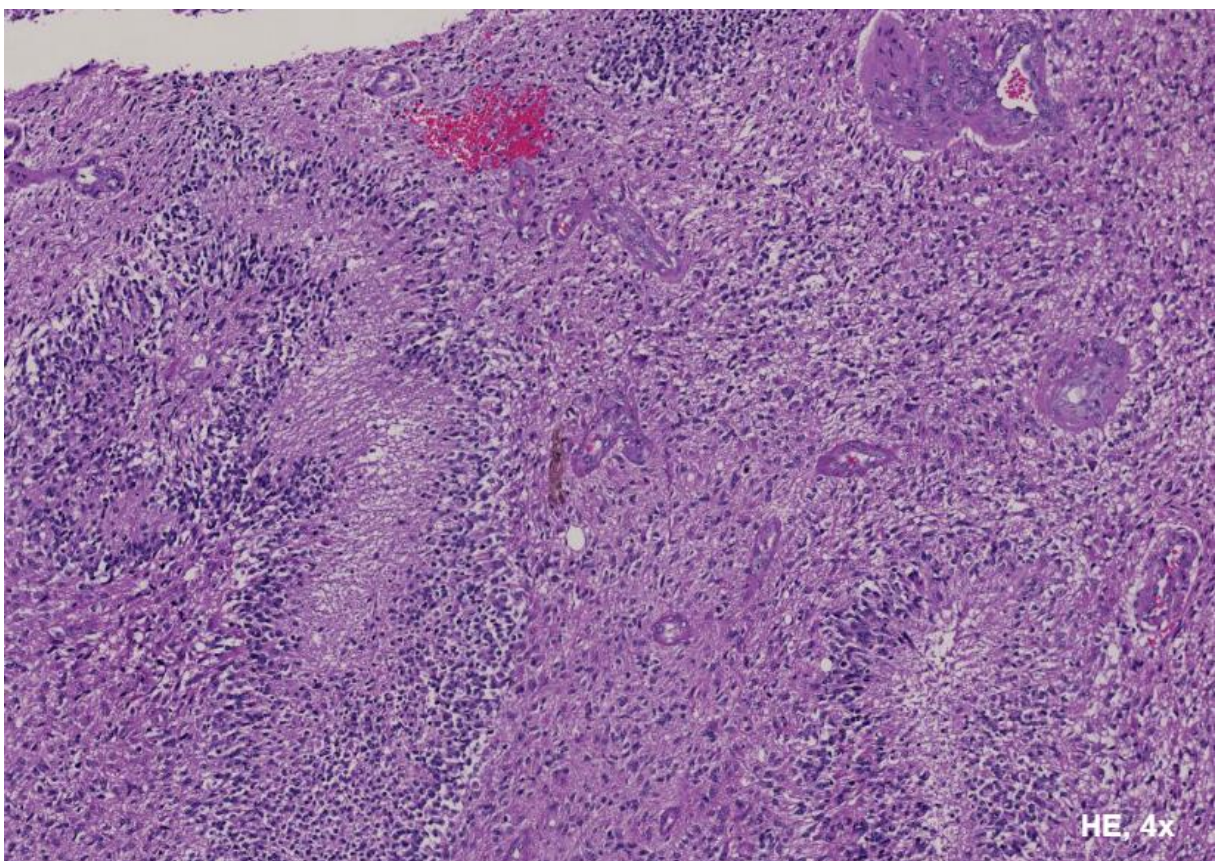


Abb. 9: Glioblastom (WHO Grad IV) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie).

1.1.4 Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) allgemein

Innerhalb der astrozytären Tumore stellt das Glioblastoma multiforme den häufigsten und den prognostisch schlechtesten Subtyp dar. Das Glioblastom wird unterteilt in ein primäres und sekundäres Glioblastom. Das primäre Glioblastom betrifft vor allem Patienten im höheren Lebensalter (median circa 65 Jahre) (Ohgaki and Kleihues 2013). Demgegenüber entwickelt sich das sekundäre Glioblastom zumeist bei jüngeren Patienten (zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr) im Sinne einer malignen Progression aus einem initial niedergradigen diffusen Gliom.

Die Inzidenz in Europa liegt bei 3,55 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Ohgaki and Kleihues 2005, 2007). Von dieser Erkrankung sind häufiger Männer betroffen (Verhältnis Männer zu Frauen entsprechend des Zürcher Tumorregisters beträgt 1,34:1). Außerdem zeigt sich, dass weiße Personen, im Vergleich zur schwarzen Bevölkerung, ein höheres Risiko haben, an diesem Tumor zu erkranken (Thakkar et al. 2014).

Der bisher als einziger gesicherte ätiologische Faktor für die Krankheitsentstehung sind ionisierende Strahlen (Wingren et al. 2009). Ansonsten treten die Hirntumore überwiegend sporadisch auf.

Bei familiären Tumorsyndromen, wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, bei dem die Patienten eine Mutation im p53 Gen besitzen, oder dem Turcot-Syndrom, mit Mutationen im Tumorsuppressorgen Adenomatosis-polyposis-coli (APC)-Protein bzw. DNA Mismatch Reparaturproteinen hMLH1 und hPMS2, findet sich ein gehäuftes Auftreten von Glioblastomen, sodass hier eine genetische Ursache zur Entstehung maligner Gliome angenommen wird. Daneben werden viele weitere Mutationen als auslösender Faktor für die Gliom Entstehung diskutiert (Ohgaki 2004; Goodenberger and Jenkins 2012). Auch Kinder können von dieser Krankheit betroffen sein, bei denen jedoch häufig ebenfalls eine genetische Prädisposition vorhanden ist (Wu et al. 2014).

Das Glioblastoma multiforme ist ein häufig rasch progredienter Tumor, welcher in allen Bereichen des Gehirns vorkommt. Je nach Lage der astrozytären Neoplasie werden Patienten mit Ausfallserscheinungen, epileptischen Anfällen, Schmerz oder Hirndrucksymptomatik vorstellig. Die mittlere Überlebenszeit liegt derzeit, trotz multimodaler Therapien in Form von operativer Tumorresektion, Bestrahlung und Chemotherapie bei 14,6 Monaten nach Diagnosestellung, (Stupp et al. 2005).

Radiographisch zeigt sich zumeist eine ringförmige Kontrastmittelaufnahme und eine zentral zystische Formation. Das klassische Bild eines Schmetterlingsglioms stellt sich dar, wenn der Tumor, begründet

durch die Eigenschaft des diffusen Wachstums, über den Balken (Corpus callosum) auch auf die andere Großhirnhemisphäre wächst.

Eine komplette Tumoresektion ist in der Regel nicht möglich. Als prognostisch günstigere Faktoren gelten ein jüngeres Alter bzw. das Vorliegen eines sekundären Glioblastoms, frontale Lokalisation und somit die Möglichkeit einer ausgedehnten Tumoresektion (Sanai and Berger 2008) bei Erstoperation, eine oligodendrogliale Komponente (Kanno et al. 2012), eine Methylierung der DNA in Form eines „glioma CpG island methylator phenotype“ (gCIMP) (Noussmehr et al. 2010), eine Methylierung der CpGs der O6-Methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT) (Hegi et al. 2005), eine Isocitratdehydrogenase (IDH) Mutation (Yan et al. 2009; Combs et al. 2011) und ein Karnofsky Index über 70 (Chaudhry et al. 2013).

1.1.4.1 Genetik Glioblastom

Die genetischen Aberrationen sind, je nach Erkrankungsalter, vielfältig und unterschiedlich häufig. Besonders häufig treten Deletionen im Tumorsuppressorgen p53 (Chromosom 17), im Retinoblastomsuppressorgen RB1 (Chromosom 13), Deletionen in Chromosom 22 und vollständigem Verlust des langen Arms von Chromosom 10 mit Ausfall des teils als Tumorsuppressor fungierenden PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) auf (Mellinghoff et al. 2005; Ohgaki and Kleihues 2007).

Bei sekundären Glioblastomen, die als Progredienz aus niedergradigen Astrozytomen verstanden werden, sind häufiger TP53 Aberrationen zu beobachten. Daneben finden sich hier nicht selten Mutationen im IDH Gen (Parsons et al. 2008; Watanabe et al. 2009).

Primäre Glioblastome, welche bei höherem Lebensalter auftreten, zeigen gehäuft PTEN Deletionen und EGFR Amplifikationen (Ohgaki 2004).

Bei den seltenen kindlichen Glioblastomen werden gehäuft H3F3A Mutationen detektiert (Schwartzentruber et al. 2012).

1.1.4.1.1 O6-Methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT)

Die O6-Methylguanin DNA Methyltransferase ist ein Protein, welches im Zellkern lokalisiert ist und dort der Reparatur alkylierter DNA dient. Alkylierte DNA ist ein Trigger zur Einleitung der Apoptose. Das MGMT Protein ist in der Lage die Methylgruppe von 6-O-Methylguanodin auf sich zu übertragen um Guanodin herzustellen. Dabei wird MGMT verbraucht, weshalb es streng genommen kein Enzym ist.

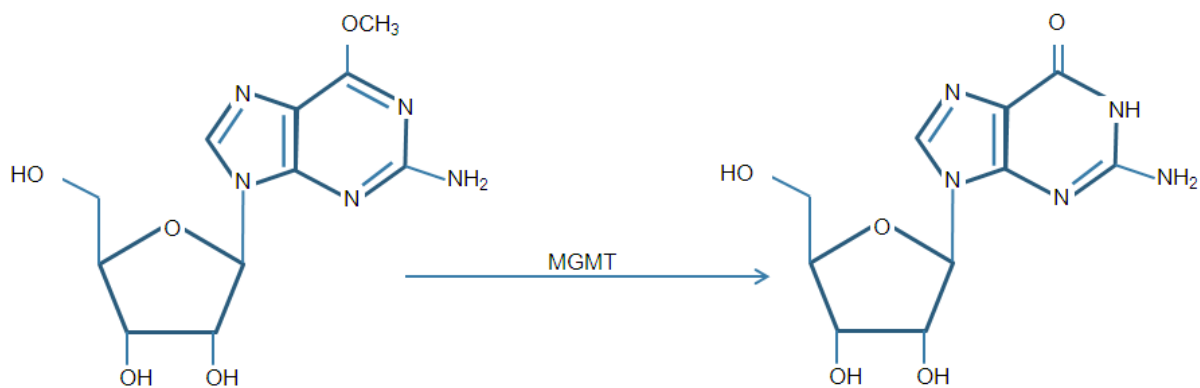


Abb. 10: Demethylierungsschema MGMT.

Der Grad der Expression von MGMT scheint von der Methylierung bestimmter CpGs innerhalb des MGMT Gens abhängig zu sein.

In 2005 konnten Hegi et al. erstmalig in einer klinischen Studie zeigen, dass Patienten mit einem Glioblastom, welches ein Methylierungsprofil innerhalb des MGMT Gens aufwies, das mit einer niedrigen bzw. fehlenden MGMT Expression vergesellschaftet ist, unter einer Temozolomid Therapie eine deutlich bessere Prognose hatten, als Patienten bei denen der Tumor dieses Methylierungsmuster nicht zeigte (Hegi et al. 2005). Temozolomid ist ein Alkylanz, welches die DNA methyliert. Bei exprimiertem MGMT können diese chemotherapeutisch induzierten „Fehler“ repariert werden. Bei einem methyliertem CpG Pattern, welches die Expression von MGMT blockiert bzw. herabsetzt, bleiben diese Fehler bestehen und der programmierte Zelltod (Apoptose) der Krebszelle wird eingeleitet. In Krebszellen mit funktionierendem MGMT Protein bleibt diese Form der Therapie weitgehend erfolglos.

1.1.4.1.2 CD133 als diskutierter Glioblastom - assoziierter Marker

Um diesem aggressiven Tumor Einhalt zu gebieten, sind Gliom-Forscher auf der Suche nach weiteren tumorspezifischen Proteinen, die gegebenenfalls zu einem besseren Verständnis dieser Entität und möglicherweise zur Aufdeckung neuer tumoresentieller Pathways führen, welche unterdrückt oder angreifbar gemacht werden können. Im Verlauf der letzten Jahre sind eine enorme Anzahl an verschiedenen Arbeiten publiziert worden mit immer neuen Proteinen, die einen spezifischen Einfluss in der Glioblastom Entstehung einnehmen sollen. CD133 nimmt hier eine zentrale Rolle ein.

CD133 ist ein 5 Transmembran - Glykoprotein, auch bekannt unter dem Namen Prominin-1, das primär im Bereich von Zellfortsätzen exprimiert wird. Die genaue physiologische Funktion dieses Proteins ist unbekannt. Es wird unter anderem von hämatopoetischen Stammzellen (Horn et al. 1999) von endothelialen Vorläuferzellen (Corbeil et al. 2000) und neuronalen Stammzellen (Sanai et al. 2005) gebildet. Im Jahre 2004 publizierten Singh et al., dass bereits 100 CD133 - exprimierende Hirntumorzellen, welche in Mäuse injiziert wurden, ausreichten, um einen Hirntumor zu generieren, wogegen 100.000 Tumorzellen, die keine CD133 Expression zeigten, zu keiner Tumorbildung führten (Singh et al. 2004). Mit dieser Studie flammte der Begriff der Krebsstammzelle (cancer stem cell (CSC)) in der Gliomforschung auf. Hierbei geht man davon aus, dass eine pluripotente Zelle mit malignen Eigenschaften, den Ursprung für die Gliomgenese darstellt (Kreso and Dick 2014).

Unterstützend zu dieser Beobachtung fanden Soeda et al. heraus, dass CD133 positive Tumorzellen stark mit dem Hypoxie induzierenden Faktor 1α (HIF1 α) assoziiert sind, bei applizierter Hypoxie undifferenziert bleiben und somit ihre pluripotenten Stammzeleigenschaften behalten (Soeda et al. 2009).

1.1.4.1.3 ASPM (abnormal spindle like microcephaly associated protein)

ASPM ist ein Protein welches vom ASPM Gen auf Chromosom 1 im menschlichen Genom kodiert wird. Es spielt eine wesentliche Rolle in der Ausbildung des Spindelapparates und somit regulärer mitotischer Aktivität in neuronalen Vorläuferzellen (Gonzalez et al. 1990; Logan et al. 2011). Mutationen innerhalb des ASPM Gens führen zur autosomal rezessiven primären Mikrozephalie (MCPH). Solche Personen besitzen ein kleines, ansonsten jedoch makroskopisch regelrecht geformtes Gehirn und sind mental leicht- bis mittelgradig retardiert (Pattison et al. 2000).

ASPM ist hoch exprimiert in vielen Tumorzelllinien, darunter auch in malignen Gliomen (Pattison et al. 2000; Bikey et al. 2010). In diesen Arbeiten wird gezeigt, dass ASPM kaum von nicht neoplastischen Hirnzellen exprimiert wird, aber die Expression innerhalb von Astrozytomen direkt mit dem WHO Grad korreliert. Zusätzlich hatte der ASPM knockdown ein erhöhtes Sterben von Gliomzellen *in vitro* zur Folge, woraus die Autoren schlossen, dass es sich um ein „attraktives therapeutisches Ziel für die Gliomtherapie“ handeln könnte.

1.1.4.2 Therapie

1.1.4.2.1 Standardtherapien

Die Therapieoptionen sind je nach Tumorentität unterschiedlich und beinhalten die chirurgische Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie.

Bei Tumoren mit abgegrenztem Wachstum zum umgebenden Hirnparenchym wird in der Regel versucht, unter einem kurativen Ansatz, die komplette Raumforderung zu entfernen. Je nach Zugangsmöglichkeiten und Lage der Neoplasie ist dies mehr oder minder möglich.

Bei Tumoren mit einem infiltrativen Wachstum zeigt sich, dass ein initial ausgedehntes neurochirurgisches „Tumorebulking“ (Pichlmeier et al. 2008; Sanai and Berger 2008) einen prognostisch besseren Verlauf hat. Ein kurativer Ansatz ist hier in der Regel nicht möglich.

Die perkutane Bestrahlung ist von zentraler Bedeutung und bietet einen eindeutigen prognostischen Vorteil (Scott et al. 2011). Bis zu einem Alter von 65-70 Jahren liegt die Standardstrahlendosis bei 54 bis 60 Gy (Greene-schloesser and Robbins 2012).

Zu den chemotherapeutischen Ansätzen werden neben dem oben erwähnten Temozolomid noch andere Regime angewendet mit Nitrosoharnstoffen, Vinkaalkaloiden und Cytosinarabinosiden (Perry et al. 2007; Wolff 2010; Berges et al. 2014).

Um auf die Gefäßproliferation einzuwirken, wird zum Teil Avastin verabreicht. Avastin ist ein Antikörper, welcher den vascular endothelial growth factor (VEGF) bindet und somit eine VEGF Bindung an den Rezeptor verhindert. Dies führt daher in der Theorie zu verminderter Gefäßproliferation bzw. Neoangiogenese. Aufgrund neuerer Studien ist die Behandlung mit dieser Art von Medikament als Antitumor - Therapie umstritten (Iwamoto et al. 2009; Addeo et al. 2014), jedoch zeigen sich Vorteile bei der Behandlung von Hirnödemen (Nagpal et al. 2011).

1.1.4.2.2 Nicht - Standardtherapien

Aufgrund der eingeschränkten Wirksamkeit der standardisierten Behandlungsmethoden gibt es einen hohen Bedarf an neuen Behandlungsansätzen, deren Wirksamkeit experimentell und in klinischen Studien belegt werden muss. Die Liste dieser bisher nicht standardisierten experimentellen Therapien bei Glioblastomen ist lang. Im Rahmen dieser Dissertation wurden onkolytische Viren als möglicher Therapieansatz erforscht. Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2 Onkolytische Viren

1.2.1 Geschichte

Seit langer Zeit werden onkolytische Effekte von Viren beobachtet. Im Jahre 1904 wurde diese Beobachtung zum ersten Mal dokumentiert. Ein Arzt namens Dock bemerkte, dass es bei einer Patientin, die an chronisch myeloischer Leukämie (CML) erkrankt war, nach einer grippeähnlichen Erkrankungsepisode, zu einer deutlichen Reduktion der Tumormasse und Absenkung der Leukozytenzahl kam (Dock 1904; Kelly and Russell 2007). Eine weitere Beobachtung veröffentlichte DePace, welcher feststellte, dass ein Uteruskrebs nach mehrmaligem verabreichen von Tollwutimpfungen mit abgeschwächten viralen Erregern, zu einer deutlichen Regression des Tumors führte (DePace 1912).

Diese Idee blieb nicht unbeachtet und wurde im Laufe des letzten Jahrhunderts immer häufiger aufgegriffen. Die nachfolgenden Beobachtungen bezogen sich auf Tollwutvirus, Varizella Zoster- und Masern Viren. So veröffentlichten Bierman et al. einen Fall von einem 4 jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), der während dieser Erkrankung Zeichen einer Windpockeninfektion entwickelte (Bierman et al. 1953). Daraufhin kam es zu einer raschen Abnahme des Leber- und Milzvolumens auf nahezu Normalgröße, sowie zu einer Normalisierung der Leukozytenzahl. Nach Abklingen der Windpocken Erkrankung kam es erneut zu einer Tumorprogression, an der das Kind letztlich verstarb (Bierman et al. 1953; Kelly and Russell 2007). Erste therapeutische Versuche wurden ab den 50er Jahren unternommen, bei denen man Patienten mit verschiedenen Tumoren gezielt mit Viren, wie z.B. dem West Nil Virus (Southam and Moore 1951; Moore 1952) oder dem Adenovirus (Zielinski and Jordan 1969), infizierte, um somit Tumorzellen zu attackieren und zur Regression zu führen.

Der Erfolg blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück, sodass sich eine neue Art von viralem Ansatz entwickelte, das „selected virus“. Diese Art von Viren zeichnet sich dadurch aus, dass Genabschnitte in ihrem Genom, die pathogen für die gesunden menschlichen Zellen sind, herauskloniert werden und nur die Genabschnitte, die zur Vernichtung der Krebszellen beitragen, im Virus verbleiben. Die dadurch gewonnene Selektivität vermindert jedoch meistens die zytotoxische Wirksamkeit, sodass eine erneute Weiterentwicklung zur 3. Generation der generierten Viren angestrebt wurde: dem „selected armed virus“. Dafür wurden in das Virusgenom zusätzlich virenfremde Abschnitte hinein kloniert, welche in Bezug auf Krebszellen die Selektivität und die Aggressivität beeinflussen sollen (Liu et al. 2007).

In der onkolytischen Therapie wird nun versucht, die Viren mit Hilfe dieser Verfahren so spezifisch wie möglich zu machen, um somit zur gezielten Zerstörung des Tumors zu führen und gesunde Zellen unbeschadet zu lassen.

1.2.2 Therapeutischer Ansatz

In der Glioblastomtherapie sind bereits mehrere verschiedene Virenarten getestet worden, von denen es bisher das HSV 1, Reovirus, Adenovirus, Masern Virus, Parvovirus, Poliovirus und das Newcastle Disease Virus in die klinische Phase geschafft haben (Wollmann et al. 2012).

In diesen Experimenten gab es verschiedene Ansätze. Es stellte sich die Frage nach der Darreichungsform. Der Vorteil einer systemischen Gabe liegt in der zusätzlichen Erfassung von Metastasen im Körper, die allerdings bei Glioblastom Patienten eine untergeordnete Rolle spielen, da sie relativ selten beobachtet werden. Der Nachteil dieses Therapieansatzes sind unkontrollierbare systemische Reaktionen bzw. die Unsicherheit, ob das Virus auch dorthin gelangt, wo es wirken soll und das Risiko einer generierten Immunantwort mit Bekämpfung der Viren durch das Immunsystems bei mehrmaliger Anwendung.

Eine lokale Darreichungsform ist invasiver, hat allerdings wenig bis keine systemischen Nebenwirkungen zur Folge und gelangt auch sicher an den Ort an dem es der Operateur verabreicht. Zur Bekämpfung von Metastasen ist es weniger geeignet. Zu den Viren mit lokaler Darreichungsform zählen unter anderem die Adenoviren, Herpes simplex Viren und das Varizella Zoster Virus.

Zu den systemisch verabreichten Viren gehören vor allem die RNA Viren, wie z.B. das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) oder aber das Reovirus.

1.2.3 Klinisch getestete Viren in der GBM Therapie

Bis Ende des Jahres 2011 wurden 8 klinische Trials und 3 Case Reports publiziert, bei denen ca. 120 Patienten mit einem malignen Gliom einer onkolytischen Therapie unterzogen wurden. Zu den verwendeten onkolytischen Viren gehören die Varianten des Herpes simplex Virus 1 (HSV1) G207 und 1716, das Adenovirus ONYX-015, das Reovirus Reolysin und die Varianten des Newcastle Disease Virus (NDV) HUJ und MTH-68 (Wollmann et al. 2012).

Zusammenfassend zeigten sich innerhalb dieser Studien keine schwerwiegenden Virus-assoziierten Komplikationen (Rampling et al. 2000; Markert et al. 2009, 2014; Wollmann et al. 2012). Es wurde nie eine Dosis limitierende Toxizität oder maximal tolerierte Dosis erreicht. Im Allgemeinen blieben die therapeutischen Ergebnisse jedoch ernüchternd, obwohl es einzelne Fälle gab, welche ein Ansprechen auf die Therapie zeigten mit prognostisch günstigerem Verlauf.

1.2.3.1 Adenovirus - ONYX 015 (CI-1042 bzw. H101)

Das ONYX 015 ist ein Selected Adenovirus, welches das erste therapeutische onkolytische Virus darstellt, das im November 2005 offiziell für die Therapie in China zugelassen wurde (Garber 2006).

Dieses Virus ist in der Lage maligne nasopharyngeale Plattenepithelkarzinome, die sich mitunter auch bis auf den Nacken ausbreiten können, in Verbindung mit Chemotherapeutika, zu bekämpfen, mit zum Teil imposanten Ergebnissen (Khuri et al. 2000; Lamont et al. 2000).

Wie alle Adenoviren ist es ein doppelsträngiges bekapseltes DNA Virus mit einem Genom von 36kb Größe. Die viralen Gene von Adenoviren kann man in 2 Gruppen einteilen: (a) frühe Gene und (b) strukturelle Gene. Dabei interagieren die Translationsprodukte der frühen Gene mit Mechanismen der Zelle, die für die Qualitätskontrolle bzw. Abwehrmechanismen der Zelle verantwortlich sind. E1A interagiert mit dem zellulären Retinoblastom Tumorsuppressor Protein (pRb) und p300, wodurch es die Zellen forciert in die S Phase einzutreten. Das Protein E1B bindet an das p53 System und verhindert somit die Apoptoseeinleitung. Die virale DNA Replikation wird durch E2 reguliert. Die Aufgabe von E3 Genprodukten liegt darin, antiviralen Mechanismen entgegenzuwirken. E4 Proteine inhibieren zelluläre DNA Reparaturmechanismen und den programmierten Zelltod (Apoptose) (Tatsis and Ertl 2004; Weitzman 2005). Die Grundidee bei ONYX015 ist es eine Tumorspezifität über das p53 System zu generieren (Bischoff et al. 1996).

Das p53 System bezeichnet unter anderem eine Kaskade ausgehend vom Protein 53, welches im Rahmen der Interphase, nach der mitotischen Teilung, die korrekte Funktion und Verdopplung der DNA überprüft und im Falle von massiven Fehlern die Apoptose einleitet (Vousden and Prives 2009).

Krebszellen, die Veränderungen in ihrem Genom haben und häufig immortalisiert sind, können folglich nur dann existieren, wenn sie entweder das p53 System nicht mehr besitzen, direkt funktionsuntüchtig gemacht haben oder alternative Wege besitzen, um mittels Mutationen eine gain of function zu generieren, die für das Überleben der Krebszelle von Vorteil ist (Muller and Vousden 2013).

Das ONYX 015 besitzt eine loss of function Mutation im E1B Lokus, welche das Virus daran hindert in Zellen, die ein funktionierendes p53 System besitzen, zu replizieren. Folglich kann dieses Virus nur Zellen angreifen, bei denen dieses System ausgeschaltet wurde, wie es bei Krebszellen zu etwa 50% der Fall ist (Soussi and Wiman 2007).

Die Wirkungen des Virus sind allerdings etwas komplizierter und stimmen nicht ganz mit der eigentlichen Grundidee überein. So konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass ONYX015 die Tumorzellen unabhängig von ihrem p53 Status infiziert und in diesen repliziert (Rothmann et al. 1998; Turnell et al. 1999; Geoerger et al. 2002). Vielmehr wurde von O'Shea et al. gezeigt, dass eher der späte virale RNA Export, als der p53 Verlust, die Tumorselektivität dieses Virus bestimmt (O'Shea et al. 2004).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Virus nur in Verbindung mit Chemotherapeutika einen Nutzen brachte, da es sich viel zu langsam im Tumor ausbreitete. Der Grund dafür wurde in einer Deletion im E3 Lokus gefunden, wodurch das Virus in seiner Ausbreitung stark gehemmt ist (Garber 2006).

1.2.3.2 Herpes simplex Virus 1 (HSV1)

Das HSV1 gehört zur Gruppe der Simplexviren der Herpesviridae. Es ist ein humanpathogenes bekapseltes Virus und enthält eine lineare doppelsträngige DNA von 152 kb Größe. Die Durchseuchungsrate in Deutschland liegt bei ca. 82% (Hellenbrand et al. 2005).

Klassischerweise befällt HSV1 den Mund und Rachenraum und ist daher auch allgemein hin als Lippenherpes (Herpes labialis) bekannt. Seltener kommen schwerwiegende Verläufe mit HSV Sepsis oder Herpesencephalitis vor (Berrington et al. 2009).

Nach erfolgter Erstinfektion verbleiben die Viren innerhalb der Ganglienzellen und treten in die Latenzphase (Ruhezustand) ein, wo sie lebenslang verbleiben. Unter bestimmten Umständen, wie z.B. einer Immunsuppression, kann es zur Reaktivierung kommen mit erneutem Ausbruch der Erkrankung. Die Therapie einer Herpes simplex Virus Erkrankung erfolgt mittels Virostatika, wie zum Beispiel Aciclovir. Ziel dieser Behandlung ist es den Ausbruch aus der Latenzphase heraus bzw. eine weitere Ausbreitung der viralen Infektion zu verhindern (De Clercq 2013).

In der Glioblastomtherapie wurden vornehmlich die HSV 1 Viren G207 und 1716 getestet.

Diese Viren wurden attenuiert, um eine Selektivität für die entsprechenden Zellen zu generieren, sodass „gesunde“ körpereigene Zellen möglichst nicht infiziert werden im Gegensatz zu den Tumorzellen, welche typischerweise bestimmte „Pathways“ ausschalten, um antitumorale Kontrollmechanismen zu entkoppeln. Beide Viren besitzen jeweils auf beiden Kopien eine 1 kb Deletion im RL1 Gen, welches für die $\gamma 34.5$ codiert. Es wird angenommen, dass dadurch die Neurovirulenz deutlich herabgesetzt wird (Brown et al. 1994, 1997).

Im Falle einer viralen Infektion mit dsRNA wird die Proteinkinase R (PKR) aktiviert und führt zu einer Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 α (eIF2 α). Dadurch wird die Translation und Expression weiterer Proteine über die klassische AUG Initiation gehemmt. Als Folge wird der nicht AUG Initiationsweg aktiviert, welcher zur Expression von Hitze Schock Proteinen, Interferonen und Aktivierung von NF κ B führt, wodurch die virale Infektion eingedämmt werden soll. Über Aktivierung des Tumorsuppressors Proteinphosphatase 2 (PP2A) wird der Zellzyklus und Zellmetabolismus reguliert. Durch Aktivierung des C - terminalen Teils der PKR kann des Weiteren die Apoptose der Zelle eingeleitet werden (García et al. 2006).

Wenn die virale $\gamma 34.5$ vorhanden und funktionstüchtig ist, führt dies hingegen zu einer Aktivierung der zellulären Proteinphosphatase 1 (PP1), welche eine Dephosphorylierung des eIF2 α zur Folge hat und somit zu einer Translation und Expression viraler Proteine führt und eine virale Replikation ermöglicht. Außerdem wird dadurch auch der nicht AUG Initiationsweg mit den oben genannten antiviralen Mechanismen umgangen.

Eine weitere Funktion von $\gamma 34.5$ ist die Bindung des „proliferating cell nuclear antigens“ (PCNA), um die virale Replikation zu triggern. Zu Guter Letzt führt es zu einer Runterregulation der MHCII Expression (Kanai et al. 2012). Durch die Inaktivierung von $\gamma 34.5$ repliziert das Virus nur in Zellen, bei denen der PKR Signalweg verändert beziehungsweise gestört ist.

Zusätzlich zu dieser Mutation besitzt HSV1 G207 noch eine funktionsinaktivierende lacZ Insertion im UL39 Gen, welches für die große Untereinheit der viralen Ribonukleotidreduktase kodiert. So kann das Virus nur in sich teilenden Zellen replizieren (Markert et al. 2009).

Aufbauend auf G207 wurde eine weitere Generation, das HSV G47 Δ , geschaffen, mit einer Deletion in ICP47, was eine Hochregulation von MHC I mit daraus resultierender erhöhter Lymphozyteninfiltration zur Folge hat (Todo et al. 2001). Zusätzlich kommt es zu einer Überregulierung von US11, was wiederum in einen schnelleren Replikationszyklus des Virus mit höheren Titern, bei gleichbleibender Attenuierung gegenüber gesunden Zellen, resultiert.

In mehreren klinischen Studien wurden diese HSV1 Viren getestet. Leider blieben jedoch einschlägige onkolytische Erfolge aus (Markert et al. 2000).

1.2.3.3 Reovirus

Der Begriff Reovirus steht für respiratory enteric orphan, unter der Annahme, dass Viren dieser Gruppe lediglich Atemwegserkrankungen (respiratory), Darmerkrankungen (enteric), oder keine Erkrankung (orphan) zur Folge haben.

Das Reovirus ist ein unverhülltes Virus mit doppelsträngiger RNA (dsRNA). Eine Infektion bewirkt eine ausgeprägte Aktivierung der PKR, wodurch die viralen Effekte in infizierten nicht tumorösen Zellen deutlich herabgesetzt bzw. aufgehoben werden. In Tumorzellen mit aktivierter RAS Kaskade ist die Wirkung von PKR aufgehoben (Strong et al. 1998). Dadurch können die viralen Effekte ungehindert in diesen Zellen auftreten mit daraus resultierender RAS abhängiger Tumorzell - Selektivität.

In der Gliomtherapie zeigten diese Viren beeindruckende onkolytische Ergebnisse sowohl *in vitro* (Coffey et al. 1998), als auch *in vivo* (Wilcox et al. 2001), welche den Weg für 2 klinische Studien ebneten. In einer Studie wurden 12 Patienten mit malignen Gliomen 10^7 , 10^8 oder 10^9 Plaque Forming Units (PFU) des Reovirus verabreicht. Dabei zeigte zumindest ein Patient ein Überleben von über 54 Monaten (Forsyth et al. 2008).

1.2.3.4 Newcastle Disease Virus

Das Newcastle Disease Virus (NDV) ist ein avian Paramyxovirus mit „negative single stranded“ (ss-) RNA Genom. Das Virus ist in der Vogelwelt gefürchtet und wird aufgrund der verheerenden Pathogenese als „Vogelpest“ bezeichnet. Beim Menschen sind bisher keine NDV bedingten Krankheiten bekannt.

Es wurden 5 verschiedene NDV Stämme auf ihr onkolytisches Potential hin getestet (Sinkovics and Horvath 2000; Zulkifli et al. 2009). Die zugrundeliegenden Mechanismen, wodurch die Tumorselektivität und Wirksamkeit erreicht wird, sind bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Vermutlich scheint sowohl eine Hochregulation des RAS Systems (Lorence et al. 1994) im Tumor, wie auch eine TNF- α Ausschüttung von mononukleären Zellen, mit antitumoralem Effekt des körpereigenen Immunsystems (Lorence et al. 1988), eine Rolle zu spielen.

In der Glioblastomtherapie wurden bis 2012 vier klinische Studien durchgeführt, mit zum Teil imposanten Ergebnissen. So präsentierten Csatory et al. Fälle von Patienten mit Glioblastomen, die trotz Standardtherapie, bestehend aus Tumorresektion, Bestrahlung und Temozolomidgabe (Temodal), eine Tumorprogression zeigten (Csatory et al. 2004). Nach zusätzlicher kontinuierlicher Behandlung mit dem Virusstamm NDV MTH-68/H kam es bei 4 von 14 Patienten zur Tumorremission (Überlebenszeit bis Publikation (mindestens 5-9 Jahre)). Insgesamt waren 7 von 14 Patienten bis zum Zeitpunkt der Publikation am Leben, von denen bei drei Patienten, aufgrund der kurzen Behandlungsdauer (4 - 18 Monate), noch keine schlussfolgernden Aussagen möglich waren. Fünf Patienten verstarben an der Hirntumorprogression und 2 Patienten sind an nicht-hirntumorassoziierten Erkrankung verstorben.

1.2.4 Weitere experimentell getestete onkolytische Viren in der GBM Therapie

1.2.4.1 Poliovirus

Das Poliovirus gehört zur Familie der Picornaviridae und ist ein „positive single stranded“ (ss+) RNA Virus. Eine Infektion mit diesem Virus führt beim Menschen zur Poliomyelitis oder auch Kinderlähmung, einer Erkrankung die insbesondere im Rückenmarksbereich die Motoneurone befällt und zu Lähmungserscheinungen bei den Betroffenen führt. Die Neurotoxizität des Virus erfolgt über den spezifischen Eintritt des Virus in die Zelle mittels Rezeptor CD155, sowie über das Vorhandensein einer internal ribosomal entry site (IRES) (Semler 2004).

In vielen Glioblastomen gibt es eine erhöhte Expression des CD155 Rezeptors (Merrill et al. 2004).

Als therapeutischen Ansatz modifizierten Gromeier et al. den Poliovirusstamm (Sabin) derart, dass sie die Polio IRES Sequenz durch die eines nicht humanpathogenen Rhinovirus Typ 2 austauschten (Gromeier et al. 1996). Dieses modifizierte Virus (PVS(RIPO)) zeigte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* onkolytische Effekte ohne im Tiermodell neurotoxisch zu sein (Gromeier et al. 2000; Cello et al. 2008; Goetz and Gromeier 2010). Die Phase I Studie ist momentan aktiv (NCT01491893).

1.2.4.2 Masernvirus

Das Masernvirus gehört zur Familie der Paramyxoviridae und ist ein „negative single stranded“ (ss-) RNA Virus. Dieses humanpathogene Virus kann neben den klassischen Symptomen wie Masernflecken, auch

zur schwerwiegenden subakuten sklerosierenden Panencephalitis führen, welche in der Regel tödlich verläuft.

Die onkolytische Spezifität wird über das Hämagglutinin H und das Fusionsprotein F erreicht. Durch Mutationen im Hämagglutinin H, mittels des attenuierten Edmonston Stammes, besitzt dieser Virustyp eine hohe Affinität zum CD46 Rezeptor, welcher bei vielen Tumoren hochreguliert ist (Dörig et al. 1993; Jurianz et al. 1999). Das F Protein ist dafür verantwortlich das verschiedene Zellen miteinander fusionieren und sogenannte Synzytien bilden (Galanis et al. 2001) was später zur Apoptose führt.

2002 wurde ein Masernvirus kreiert, welches zur Expression des carcinoembryonalen Antigens (CEA) führt, um die virale Aktivität zu monitoren. Dieses Virus zeigte einige vielversprechende Ergebnisse in der präklinischen Phase in Mäusen und nicht-Menschenaffen (Allen et al. 2008), sodass es den Weg in eine klinische Phase I Studie geschafft hat (NCT00390299). Außerdem sind weitere Virenstämme hergestellt worden, welche single-chain Antikörper gegen die häufig in Glioblastomen exprimierten Proteine EGFRvIII oder Interleukin13 als Ligand für den glioblastomspezifischen Rezeptor IL13R α 2.

1.2.4.3 Parvovirus

Das Parvovirus gehört zur Gruppe der Parvoviridae und ist ein unverhülltes einsträngiges (ss) DNA Virus. Mit Ausnahme von Parvovirus B19, das beim Menschen die Ringelröteln (Erythema infectiosum) hervorruft, sind bisher keine weiteren humanpathogenen Wirkungen dieser Virusfamilie bekannt. Man kann die Parvoviren in drei Gattungen einteilen:

1. Dependoviren: Diese Viren sind nicht in der Lage selbständig zu replizieren, sondern benötigen dazu Helferviren. Zu diesen Helferviren gehören Adenoviren, Herpesviren oder Vacciniaviren. Beim Fehlen dieser Helferviren treten die Dependoviren in einen Latenzzustand indem sie sich ins Genom einbauen und ein Leben lang dort verbleiben.
2. Erythroviren: Diese Viren besitzen einen Tropismus zu den sich teilenden Vorläuferzellen der Erythrozyten, den sogenannten Erythroblasten, da sie für ihre eigene Replikation auf die S-Phase der Zelle im Mitosezyklus angewiesen sind. (z.B. Ringelröteln)
3. Autonome Parvoviren: Diese Viren sind ausschliesslich tierpathogen. (z.B. Katzenseuche)

Im Allgemeinen ist eine Grundvoraussetzung für die Replikation, dass die Tumorzellen mitotisch aktiv sind. Des Weiteren scheint eine Störung im PKR Mechanismus von Vorteil zu sein (Ventoso et al. 2010). Das Parvovirus H1, welches vornehmlich Nagetiere befällt und beim Menschen bisher keinerlei Symptome verursacht hat, wurde ausgiebig in Tierversuchen auf die antigliomatöse Wirkung hin

getestet (Herrero Y Calle et al. 2004), mit guten Ergebnissen, sodass es momentan in Deutschland Einzug in eine klinische Studie gehalten hat (Geletneky et al. 2010, 2012).

1.2.4.4 Vesikuläres Stomatitis Virus

Das Vesikuläre Stomatitis Virus gehört zur Gruppe der Rhabdoviridae und ist eng verwandt mit dem Tollwutvirus. Es ist ein negatives einzelsträngiges (ss-) RNA Virus mit einem Genom welches für fünf Proteine codiert: Das Glykoprotein (G), das *Large*-Protein (L, eine Polymerase), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M) und das Nukleoprotein (N). Dabei ist das Glykoprotein für den Eintritt in die Zelle verantwortlich und das Large Protein sowie das Phosphoprotein für die Virusreplikation bestimmend. Das Matrixprotein umhüllt diese Komponenten.

Es gibt nur wenige humane VSV Infektionen, die meist nur geringe Symptome verursachen. Der Grund dafür liegt in der hohen Interferon Sensibilität des Virus (Barber 2004).

Die onkolytische Wirkweise des Virus zielt auf die eingeschränkte Interferonantwort von Tumorzellen ab. Es müssen keine p53 oder RAS Mutationen vorliegen, damit die Zellen infiziert und abgetötet werden. Somit wird gerade bei sehr heterogenen Tumorzellpopulationen, wie die von Gliomen, eine Infektion vieler verschiedener Tumorzellen ermöglicht. Zudem wird durch diese Eigenschaften ebenfalls eine systemische Gabe des Virus, zur Behandlung von Metastasen wie z.B. Lungen-, Darm- oder Brustkrebs ermöglicht.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass VSV Tumorzellen infiziert und die nicht maligne transformierten „Normalzellen“ nicht befällt (Wollmann et al. 2010). Dennoch wurde auch von toxischen Nebenwirkungen in Tierexperimenten berichtet, weshalb mehrere Versuche unternommen wurden dieses Virus zu attenuieren (Lun et al. 2006). Hierbei zeigte sich zwar ein onkolytischer Effekt in Gliomtragenden Mäusen, jedoch konnten in dieser Studie keine Tiere mittels des VSVΔM51, im Gegensatz zum oben genannten Reovirus, geheilt werden.

1.2.4.5 Varizella Zoster Virus

Das Varizella Zoster Virus (VZV oder HHV3) ist ein Alphaherpesvirus und gehört ebenfalls in die Gruppe der humanen Herpesviren (HHV).

Der Mensch ist bisher der einzige bekannte natürliche Wirt für das VZV. Bei Erstinfektion kommt es typischerweise zu Windpocken. Diese heilen in der Regel innerhalb von 21 Tagen wieder ab. Die Viren verbleiben jedoch in den Spinalganglien. Bei einer Reaktivierung, durch z.B. Immunsuppression, kommt es zur Ausbildung des Zosters (Gürtelrose), welcher, im Dermatom des virusbefallenen Spinalganglions, zu einer schmerzhaften Bläschenbildung führt. Die Therapie der Wahl sind antivirale Therapeutika wie Aciclovir oder Foscarnet, welche die Ausbreitung von VZV eindämmen (Dworkin et al. 2007). Die Durchseuchungsrate für Windpocken liegt bei Erwachsenen in der deutschen Bevölkerung, gemäß Robert Koch Institut, bei ca. 95%.

Das Virus ist membranumhüllt mit ikosaedrischem Kapsid und enthält eine lineare doppelsträngige DNA bestehend aus 124884 Basenpaaren (bp) (Davison and Scott 1986). Es existiert eine lange Region (UL) (105.000 bp), eine kurze Region (US) (5.232 bp) sowie interne (IR) und terminale Sequenzwiederholungen (TR). Es ist nahe verwandt mit den Herpes simplex Viren, da es mit diesen große Übereinstimmungen im Genom gibt. Es wurden mindestens 71 Proteine identifiziert (open reading frames (ORF)), welche größtenteils verschiedene Aufgaben bei der Replikation bzw. Infektion des Virus erfüllen. Diese wurden unter anderem in verschiedenen Tiermodellen untersucht, die humane Xenografts enthielten, um die primär humanpathogenen Eigenschaften zu testen (Zerboni et al. 2014).

Die Gene für ORF62, ORF63, ORF64, ORF69, ORF70 und ORF71 liegen doppelt vor. Der origin of replication (ori) liegt innerhalb der repetitiven Sequenz.

Das Genom kodiert für Glykoproteine und Proteine, welche die DNA Replikation, das „DNA packaging“, DNA Metabolismus, sowie den Kapsid-Aufbau steuern. Das Kapsid ist vom sogenannten Tegument eingeschlossen. Außen wird es von einer Lipidmembran umschlossen, welche die Glykoproteine gB, gH und gL birgt, die den sogenannten „minimalen Fusionskomplex“ bilden (Zerboni et al. 2014).

Zwei dieser replikationsbeeinflussenden Enzyme sind die Proteinkinasen ORF47 und ORF66.

Eines der angenommenen Eintrittsrezeptoren bei Hautzellen ist das insuline degrading enzyme (IDE), was jedoch bei der Infektion von T-Zellen keine Rolle zu spielen scheint (Li et al. 2010). Die Infektion der T-Zellen hängt vorrangig von der Expression vom Glykoprotein I (gI) ab (Moffat et al. 2002).

Der Infektionspathomechanismus von VZV beginnt bei der Erstinfektion wie folgt. Die Viren werden über die Atemluft aufgenommen und reichern sich innerhalb der Tonsillen an, wo sie mit den T-Lymphozyten in Kontakt kommen und diese infizieren über Glykoprotein E, Glykoprotein I und die Kinasen ORF47 und ORF66 (Besser et al. 2003; Schaap et al. 2005). Dabei besitzen sie einen besonderen Tropismus zu T-Gedächtnis - Zellen, welche auf Haut spezialisiert sind. Die T-Lymphozyten wandern durch den Körper

und erreichen Haut und Spinalganglien. Im Bereiche der Haut ist VZV in der Lage besonders die Epithelien der Haarfollikel zu infizieren, wo sie anschließend weiter replizieren.

Nach Infektion der Epithelien bzw. Reaktivierung der infizierten Spinalganglien erfolgt die weitere Ausbreitung in die Haut, wofür das Protein von ORF61 benötigt wird (Wang et al. 2013). Dieses besitzt „small ubiquitin like modifier“ (SUMO) interagierende Motive (SIM), wodurch es zur Verstreuung von promyelozytisch - leukämischen Kernkörperchen (PML-NBs) kommt (Wang et al. 2011). Des Weiteren besitzt die zytoplasmatische Domäne von Glykoprotein B ein Immunrezeptor tyrosinabhängiges Inhibierungsmotiv, welches die Zell-Zell Fusion und somit die Bildung von Polykaryozyten reguliert (Oliver et al. 2013). Innerhalb der infizierten Zelle bewirkt VZV eine Aktivierung bzw. Hochregulation von STAT3, was gleichzeitig zur Hochregulation von Survivin, einem anti-apoptotischen Protein führt und die Ausschüttung von Interferon α und STAT1 runter reguliert bzw. inhibiert (Sen et al. 2012). Im Gegensatz dazu zeigen die benachbarten nicht infizierten Zellen eine Hochregulation von Interferon α , zur Hemmung der Ausbreitung über Zell-Zell Kontakt, und Interleukin 1α .

ORF63 reguliert unter anderem die ORF62 Expression (Hoover et al. 2006). Zusammen mit ORF4 spielen diese Transkriptionsaktivatoren eine essentielle Rolle bei der Replikation, die aus noch nicht ganz geklärten Gründen gewebespezifisch unterschiedlich zu sein scheint.

1.3 Ziel der Arbeit

In dieser Studie soll untersucht werden, ob VZV onkolytische Eigenschaften in Gliomzellen besitzt und folglich einen weiteren möglichen Kandidaten für die onkolytische Therapie bei Glioblastomen darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Allgemeine Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Viren zu vermeiden bzw. zu minimieren. Die zugegebenen Medien wurden bei 4°C gelagert und vor Zugabe auf 37°C erwärmt, um starke Temperaturschwankungen innerhalb der Zellkultur zu verhindern.

Als Zellkultur wurden in dieser Arbeit Primärkulturen aus Patientengewebe (siehe Abschnitt 2.1.2.) generiert, mit der Bezeichnung TB (Tumorbank) und der entsprechenden Nummer. Außerdem wurden Experimente an Gliomzelllinien (U87, U251 und U373), einer Fibroblastenzelllinie (MRC5) und der Melanomzelllinie (MeWo) (käuflich erworben von der Zellkulturbank American Type Culture Collection (ATCC)), sowie an der humanen mesenchymalen Stammzelllinie (hMSC) (erworben von Lonza, Basel Schweiz) durchgeführt (Tab. 2).

Gliom Primärkulturen		Gliomzelllinien	Melanomzelllinie	Nicht neoplastische Zellkulturen
Glioblastom	anaplastisches Astrozytom			
TB402 TB402 CD133+ TB403 TB414 TB426 TB428 TB458 TB477	TB22 TB202 TB275 TB372 TB389	U87 U251 U373	MeWo	TB397 MRC5 hMSC

Tab. 2: Verwendete Zellkulturen.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert und mit dem dazugehörigen Medium versetzt. In Abhängigkeit von Zellzahl und Verbrauch wurde alle 3-5 Tage das Medium gewechselt.

2.1.1.1 Splitten von Zellen

Um eine Stagnation im Zellzyklus zu verringern, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von über 90% gesplittet. Die Zellen wurden dafür dreimal je 5min mit PBS (Dulbecco's PBS (1x) Biochrom AG) gewaschen und anschließend mit 1/5 der Mediummenge Trypsin (Invitrogen) versetzt. Nachdem sich die Zellen nach ca. 5 min bei Raumtemperatur von der Oberfläche gelöst hatten, wurde neues mit fetalem Rinderserum (FCS (Gibco, Invitrogen)) angereichertes Medium Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) hinzugegeben, um die Trypsinwirkung mit Hilfe des im FCS enthaltenen Antitrypsins zu inaktivieren. Weiterhin existierende Zellkonglomerate wurden durch mehrmalige Resuspension weiter vereinzelt. Nachfolgend wurden die Zellen bei 4°C für 5 min und 1600 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von frischem DMEM Medium - angereichert mit hitzeinaktiviertem 10% FCS, nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA), 1% Gentamizin, 0.2% Amphotericin B, 1% Penizillin/ Streptomycin, 1% NaHCO₃ und 1% Glutamin (Invitrogen) - wurden die Zellen resuspendiert und auf die weiteren Zellkulturschalen verteilt.

2.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um einen gewissen Standard zu erhalten und das Entartungsrisiko der primären Zellkulturen zu minimieren, wurden die Zellen amplifiziert und in kleinen Batches eingefroren, welche für die Experimente verwendet wurden.

Dafür wurden lebende Zellen im jeweiligen Vollmedium nach Zugabe von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt) in einem Nunc Eppendorfröhrchen für 24 Stunden bei -80°C eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C in Vollmedium kultiviert. Nach Adhärenz der Zellen, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das zytotoxisch wirkende DMSO aus der Zellkultur zu entfernen.

2.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 50 µl Trypanblau (Sigma Aldrich) versetzt, in PBS verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Es wurden nur Trypanblau-

negative, lebendige Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.1.2 Primärkultur

Die Gewebeproben der Primärkulturen entstammten aus der Tumorbank der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München, Campus Großhadern. Die Diagnosen wurden histologisch gesichert gemäß der WHO Kriterien (2007). Von allen Proben wurde eine schriftliche Einwilligung von den Patienten zur Verwendung des nicht zur Diagnosestellung benötigten überschüssigen Materials für wissenschaftliche Zwecke eingeholt.

Das Tumorgewebe wurde den Patienten im OP entnommen, anschließend in Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Im Labor wurden mit Hilfe von sterilisierten Pinzetten und Skalpellen unter der Zellkulturbank die makroskopisch sichtbaren Gefäße entfernt. Anschließend wurde der Tumor in einen Homogenisator gegeben, mit der entsprechenden Menge Medium (20% FCS) aufgefüllt und die Zellen mit einem Stößel mechanisch vereinzelt. Das Zellhomogenisat wurde nachfolgend auf die Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.3 Magnetic bead sorting (Magnetic activated cell sorting (MACS))

Magnetic bead sorting (MACS, Miltenyi, Biotec) wurde verwendet, um Zellen mit Expression von CD133 an der Zelloberfläche, aus einem Zellgemisch zu isolieren.

Dazu wurde die entsprechende Zellsuspension der Primärkultur (TB402) mit dem anti CD133 Antikörper (clone 13A4, Merck) für 2h bei Raumtemperatur und anschließend für 1h mit sogenannten MicroBeads inkubiert. Hierbei handelt es sich um etwa 50 Nanometer (nm) große Magnetpartikel, die am FC Teil von Antikörpern gebunden sind. Diese Antikörper erkennen wiederum den FC Teil des CD133 Antikörpers und können somit indirekt Zellen, die CD133 an der Zelloberfläche exprimieren, binden. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben war, wurden die mit den MicroBeads markierten Zellen vom Magnetfeld zurückgehalten und nur MicroBead negative Zellen konnten die Säule passieren. Anschließend wurde die Säule dreimal mit PBS gespült, das Magnetfeld

entfernt und die verbliebenen Zellen mittels Kulturmedium aus der Säule gelöst und als CD133 positive Population weiter kultiviert.

2.1.4 Markieren von Zellen mit Dil

Dil (DiIC₁₈(3) – Indocarbocyanid) ist ein lipophiler Farbstoff, der sich innerhalb von Zellmembranen einbaut und somit die äußere Zellmembran, sowie intrazelluläre membranhaltige bzw. lipophile Zellorganellen markiert. Daneben findet sich eine diffuse schwache Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas. Gemäß Angaben des Herstellers ist in Verbindung mit diesem Farbstoff eine geringgradige Zytotoxizität und Phototoxizität beschrieben.

Für den Konfrontationsversuch (siehe 2.1.6) wurden hMSCs mittels Dil gefärbt, um diese Zellen von den Gliomzellen bzw. MRC5 Zellen zu unterscheiden. Dafür wurden 90% konfluierende hMSCs zweimalig für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro ml serumfreies DMEM 5µl Dil (Invitrogen) hinzugegeben und gleichmäßig gemischt. Nachdem dieses Dil-Medium Gemisch für 20 min auf die hMSCs gegeben wurde, wurden die nun Dil markierten hMSCs einmalig mit PBS und anschließend 2 malig mit DMEM gewaschen und danach regulär weiter kultiviert.

2.1.5 Zellsphäroid

2.1.5.1 Sphäroid Design

Sphäroide sind kugelförmige Zellhaufen, die je nach Größe der Zellen aus etwa 3000 bis 6000 Zellen bestehen können, um stabil zu sein. Diese Gebilde finden zum Beispiel Anwendung bei der Simulation eines dreidimensionalen Tumors oder bei Migrations- oder Konfrontationsassays. Zur Generierung dieser Zellsphäroide stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde überwiegend die Agar noble Methode und die hängender Tropfen Methode verwendet.

2.1.5.1.1 Agar noble Methode

96-well Platten wurden mit 60µl Agar noble (1% in PBS) befüllt und über Nacht bei 4°C gekühlt. Zellen der Zellkultur wurden entsprechend Kapitel „2.1.1.1 Splitten von Zellen“ vereinzelt und anschließend in

der Neubauer Zählkammer gezählt. Pro well wurden 4000 Zellen zugegeben und so bewegt, dass die Zellen möglichst gleichmäßig im well verteilt waren.

Nach 3 Tagen Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ hatten sich Zellsphäroide gebildet.

2.1.5.1.2 Hängender Tropfen Methode

Zellen der Zellkultur wurden entsprechend Kapitel „2.1.1.1 Splitten von Zellen“ vereinzelt und anschließend in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde so eingestellt, dass sich ca. 70 Zellen/μl Vollmedium befanden. Anschließend wurden ca. 60μl der Zellsuspension als Tropfen auf die Innenseite des Deckels pipettiert und der Deckel anschließend umgedreht, sodass ein hängender Tropfen entstand. Hierin formten sich innerhalb von 3 Tagen stabile Sphäroide.

2.1.5.2 Einbetten

Im Vorfeld wurden Cryo Tissue Tek Sockel generiert, indem Cryo Tissue Tek Medium auf Kork gegeben und über flüssigem Stickstoff gefroren wurde. Die Zellsphäroide wurden mittels einer 100μl Pipette angesaugt und auf einen bereits gefrorenen Cryo Tissue Tek Sockel überführt. Anschließend wurde eine neue Schicht Cryo Tissue Tek darüber gegeben und die Proben mittels Isopentan erneut über flüssigem Stickstoff gefroren.

2.1.5.3 Schneiden

Tissue Tek eingebettete Sphäroide wurden in einem Kryotom bei -15°C etwa 20 μm dick geschnitten und auf einen Objektträger überführt.

2.1.6 Konfrontationsassay

Für den Konfrontationsassay wurden zwei Sphäroide unterschiedlicher Zell-Art in räumliche Nähe zueinander gebracht und die Migration der einzelnen Zellen analysiert.

Dazu wurden Zellsphäroide gemäß Kapitel 2.1.5 generiert. Die zwei stabilen dreidimensionalen Gebilde deren Migrationsverhalten zueinander untersucht werden sollte, wurden mittels 200μl Pipette

angesaugt und zusammen in ein well der Agar noble beschichteten 96 well Platte überführt. Die Sphäroide wurden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Alle 4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.1.7 VZV Infektion *in vitro*

2.1.7.1 Hintergrund der verwendeten Viren

POKA VZV ist ein VZV Stamm der in den 70er Jahren von einem Patienten namens Oka in Japan isoliert wurde (Ozaki and Asano 2016). Dieses Wildtyp Virus wurde in den darauffolgenden Jahren mehrfach attenuiert, um ihn als Impfung einzusetzen (vOKA).

Das Virus repliziert und breitet sich innerhalb des menschlichen Körpers und auch innerhalb einer *in vitro* Zellkultur über Zell - Zell Kontakte aus.

In dieser Arbeit wurden sowohl das pOKA Virus, als auch 3 Mutante verwendet. VZV rOKA/ORF63rev[T171] ist ein Abkömmling des Vakzinavirus vOKA mit einer Punktmutation (T171A) im Transkriptionsregulationsprotein IE63 (Baiker et al. 2004). Die VZV Mutante rOKA/47ΔC ist ebenfalls ein Abkömmling von vOKA und enthält eine trunkierte Form der viralen Serin/ Threonin Kinase ORF47 (Besser et al. 2003). Die letzte in dieser Arbeit verwendete VZV Mutante pOKA66S stammt vom pOKA Virus ab und enthält eine Deletion in der Serin/ Threonin Kinase ORF66 (Schaap-Nutt et al. 2006).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Varizella Zoster Viren lagen in der Form, in der wir sie von Dr. Ann Arbor (Stanford University, CA, USA) erhalten haben, in MeWos, einer humanen Melanomzelllinie, replizierend vor. Um bei den Wachstumsexperimenten einen Nebeneffekt durch die Anwesenheit von anderen Krebszellen so gering wie möglich zu machen, wurde das pOKA Virus auf MRC5 Zellen, einer humanen Fibroblastenzelllinie, übertragen. Dafür wurden zu einer konfluenten MRC5 Zellkultur infizierte MeWo Zellen gegeben. Nach 5 Tagen wurden diese trypsiniert und damit erneut konfluente MRC5 Zellen infiziert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit von infizierten MeWos zu minimieren. Anschließend wurden die VZV tragenden MRC 5 Zellen eingefroren.

2.1.7.2 Ermittlung der Plaque Forming Units

Um die Anzahl der Plaque Forming Units (PFU), also der Menge Virus zu bestimmen, die ein Plaque innerhalb einer konfluenten MeWo Zellkultur hervorruft, zu ermitteln, wurden in jedes well einer 6 well Platte MeWo Zellen ausgesät, die bis zu einer Konfluenz von 90% wuchsen. Anschließend wurde zu den wells eine aufsteigende Verdünnung von VZV infizierten MRC5 Zellen hinzugegeben ($1 - 1/10^5$). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. Je nach Viruskonzentration bildeten sich unterschiedliche Mengen an Plaques innerhalb der MeWo Zellkultur aus. Hierbei wurde der Verdünnungsfaktor des Virus, welcher gerade noch zur Ausbildung von Plaques führte, mit der Anzahl der Plaques in dem entsprechenden well multipliziert, um die Menge an PFUs des Virus zu ermitteln. Nach Abschluss der Virusbehandlung wurde von den Zellkulturen das Medium abgesaugt und die Zellen für 20 min mit Crystal Violet Färbelösung (0.5g Crystal Violet, 27ml 37% Formaldehyd, 100ml 10x PBS, 10ml Methanol, 863ml dH₂O) fixiert.

2.1.7.3 Replikationsgeschwindigkeitsanalyse

Die Zelllinie U251 und die primären Zellkulturen TB426 und TB402 wurden mit 250 PFU (Tag 0) der verschiedenen Viren (pOKA, pOKA66s, rOKA47ΔC und rOKA/ Orf63rev[T171]) über maximal 7 Tage inkubiert und an den Tagen zwei bis sieben täglich ein Ansatz asserviert. Die Asservate wurden anschließend auf konfluenten MeWo Zellen austitriert (siehe 2.1.7.2) und die Anzahl der PFUs ermittelt.

2.1.8 Immunzytochemie

Mit Hilfe der Immunzytochemie kann man die Expression von bestimmten Proteinen innerhalb einer Zellkultur mit Hilfe von Antikörpern, die gegen diese Proteine gerichtet sind, untersuchen. Diese Antikörper sind in der Regel an farbkatalysierende Enzyme oder Fluorochrome gebunden, sodass die Antikörper indirekt visualisiert werden können, was Rückschlüsse auf das Vorhandensein und deren Lokalisation, oder aber die Abwesenheit der zu untersuchenden Proteine erlaubt.

Immunzytochemische Untersuchungen wurden entweder an gemäß 2.1.5.3 generierten Sphäroid Schnitten, oder an mit Zellen bewachsenen Deckgläsern durchgeführt. Hierfür wurden ca. 5000 Zellen in 500µl Vollmedium auf Deckgläser ausplattiert und diese für 2 Tage im Brutschrank kultiviert.

2.1.8.1 Varizella Zoster Virus Färbung

Die Sphäroidschnitte und Deckglas bewachsenen Zellen wurden für 10 min mit eiskaltem 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und anschließend mit eiskaltem phosphate buffered saline (PBS) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen für 1h bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus PBS, 30% Ziegen Serum, und 0,3% Triton X – 100 blockiert, um unspezifische Bindung mit den Primär- bzw. Sekundärantikörpern zu reduzieren. Daraufhin wurden die Proben 3-mal für je 5 min in PBS gewaschen und nachfolgend für 8h bei 4°C mit dem primären Antikörper (Varizella Zoster Serum, von einem Patienten gewonnen) versetzt, der in einem Gemisch von PBS, 3% Ziegen Serum und 0,3% Triton X-100 im Verhältnis 1:1000 verdünnt wurde.

Nach erneutem 3-maligem Waschen für je 5 min in PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper (Alexa 488 anti-human), entsprechend der zuvor erwähnten Antikörperfärbelösung im Verhältnis 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt. Nachfolgend wurden die Zellen jeweils für 5 min einmal in PBS mit 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:5000) und anschließend zweimal in reinem PBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit Vectashield mounting Medium eingedeckt, die Deckgläser mit Klarlack fixiert und unter Lichtabschluss bei 4°C gelagert. Die Proben wurden am Olympus Mikroskop ausgewertet.

2.1.8.2 CD133 und ASPM Färbung

Die hierfür entsprechend 2.1.2 vorbereiteten Zellkulturen wurden für 10 min mit eiskaltem 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen für 1h bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus PBS, 30% bovinem Serumalbumin, und 0,3% Triton X – 100 blockiert, um unspezifische Bindung mit den Primär- bzw. Sekundärantikörpern zu reduzieren. Daraufhin wurden die Proben 3-mal für je 5 min in PBS gewaschen und für 2h bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (AC133, Miltenyl (1:200) bzw. ASPM, Novus Biologicals (1:250)) in einem Gemisch von PBS, 3% BSA und 0,3% Triton X-100 inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 3-mal für je 10 min gewaschen und mit einem sekundären Antikörper (AC133 anti-Biotin-Alexa488, ASPM Goat anti Rabbit Alexa488) in einer Verdünnung von 1:500 mit der zuvor genannten Antikörperfärbelösung versetzt. Anschliessend wurden die Zellen jeweils für 5 min einmal in PBS mit 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:5000) und zweimalig je 5 min bei Raumtemperatur in reinem PBS gewaschen.

2.2 Westernblot

2.2.1 Protein Separation und Blot

Mit VZV infizierte U251 Zellen und Primärkulturen wurden mit Hilfe des Zellysepuffers (50mM TrisHCl (pH 7.4), 0.5% NP-40, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF (Proteaseinhibitor)) 30min bei Raumtemperatur lysiert und das Lysat anschließend bei -80°C gelagert. Vor dem Laden des Gels wurden die Proteinkonzentration der Proben mittels Bradford Assay und Eppendorf Biophotometer auf eine Konzentration von $30\mu\text{g}$ Protein je $20\mu\text{l}$ Ansatz eingestellt.

Der Lämmli Puffer wurde mit 5% β -Mercaptoethanol versetzt und anschließend jeweils $12\mu\text{l}$ Lämmli Puffer Gemisch zur Probe hinzugegeben. Das Stoffgemisch wurde für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurden $30\mu\text{l}$ der Proben in die käuflich erworbenen Gele (SDS PAGE, Biorad) geladen und mittels Laufpuffer (3.03g Tris base, 14.4g Glyzin, 1.0g SDS gelöst in 1l H_2O) bei 110V für 80 min separiert. Danach wurden die Proteine mit Transferpuffer TBS (20 % Methanol, 192 mM Glyzin, 25 mM Tris-base, pH 8.3) bei 30V für 90min auf eine PVDF Membran gebloftet, welche zuvor für 10 Sek in 100% Methanol aktiviert, darauffolgend für 2 min in Aqua Dest. und erneut für 5 min in TB Puffer gewaschen wurde.

2.2.2 Signaldetektion

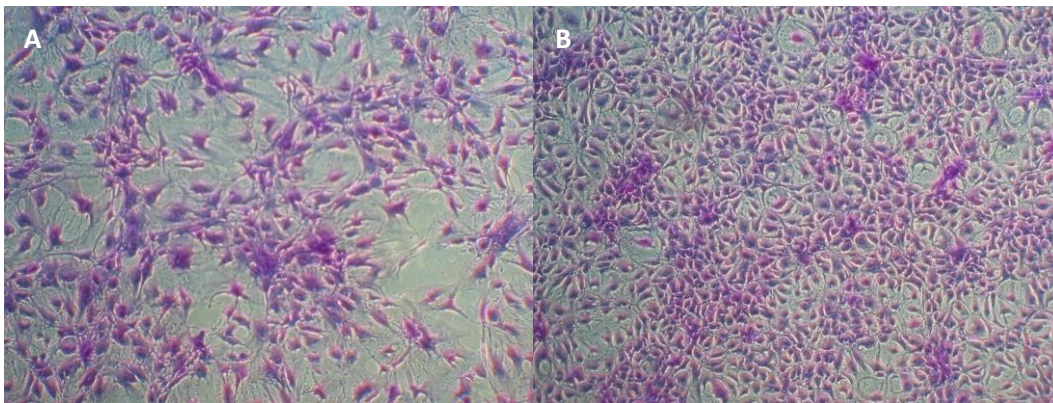
Die gebloftete Membran wurde für 5 min in TTBS (TBS + 0.05% Tween 20) auf einem Schüttler gewaschen und anschließend für 50 min in 5% nonfat milk (gelöst in TTBS) geblockt, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde in 0,25% nonfat milk in TTBS Lösung gelöst und über Nacht bei 4°C auf einem Rüttler inkubiert.

Nachfolgend wurde die Membran sechsmal für jeweils 5 min in TTBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, gelöst in 0,25% nonfat milk TTBS Lösung, für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten sechsmaligen Waschschrift in TTBS, für je 5 min, wurde die Membran mit dem Chemolumineszenz-Reagenz-System (Pierce ECL Western Blotting 17 Substrate #32209, Thermo Fisher Scientific) inkubiert, bevor die Banden der Membran mit Hilfe eines Films (Fuji Medical Xray) in der Dunkelkammer entwickelt wurden.

3 Ergebnisteil

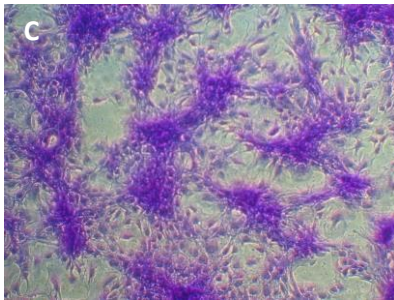
3.1 Generierung von Primärkulturen

Die ausplattierten Primärkulturen von Glioblastomgewebe zeigten ein heterogenes Bild (siehe Abb. 11). Hierbei fanden sich teils polymorphe Zellen (z.B. TB426, Abb. 11A) mit unregelmäßig geformten Zellkernen sowie Zellkulturen mit teils kleinzelligem (z.B. TB402, 11B) und teils balkenartigem Wachstumsmuster (z.B. TB 389, 11C).



TB426

TB402



TB389

Abb. 11: Morphologie der Primärkulturen. (A) zeigt TB426 mit einem pleomorphen Zellbild. (B) zeigt exemplarisch TB402 welche eine kleinzellige Morphologie aufweist. In (C) ist die 3. morphologische Variante dargestellt mittels TB389, die durch in Balkenstrukturen wachsende Tumorzellverbände gekennzeichnet ist (Crystal Violet Färbung, Vergrößerung 10x).

3.2 VZV Replikation in Gliomzelllinien und Primärkulturen

3.2.1 Zellshuttle für VZV Infektionen

Da VZV sowohl innerhalb des Körpers, als auch *in vitro* eine Zell assoziierte Replikation und Infektion der benachbarten Zellen zeigt, wurde die aus nicht neoplastischen Zellen generierte Fibroblastenzelllinie MRC5 als virustragendes Zellshuttle für die meisten nachfolgenden Experimente herangezogen, um auszuschließen, dass die bis dato als Standard verwendete Melanomzelllinie MeWo, aufgrund ihres tumoralen Verhaltens, Auswirkungen auf die Wachstumsversuche der Gliomkulturen hat.

Im Unterschied zur Melanomzelllinie MeWo (siehe Abb. 12A), welche nach VZV Infektion klassischerweise eine Synzytienbildung (Sy) und Plaqueformation (P) aufweist, finden sich in der mit VZV infizierten MRC5 Zellkultur (Abb. 12B) Straßen von infizierten Zellen, welche teils kontrahiert erscheinen und im späteren Verlauf ihre Adhärenz zur Oberfläche verlieren, was zu einer Plaqueformation führt. Die Synzytienbildung steht, im Gegensatz zur MeWo Zelllinie, hier nicht im Vordergrund.

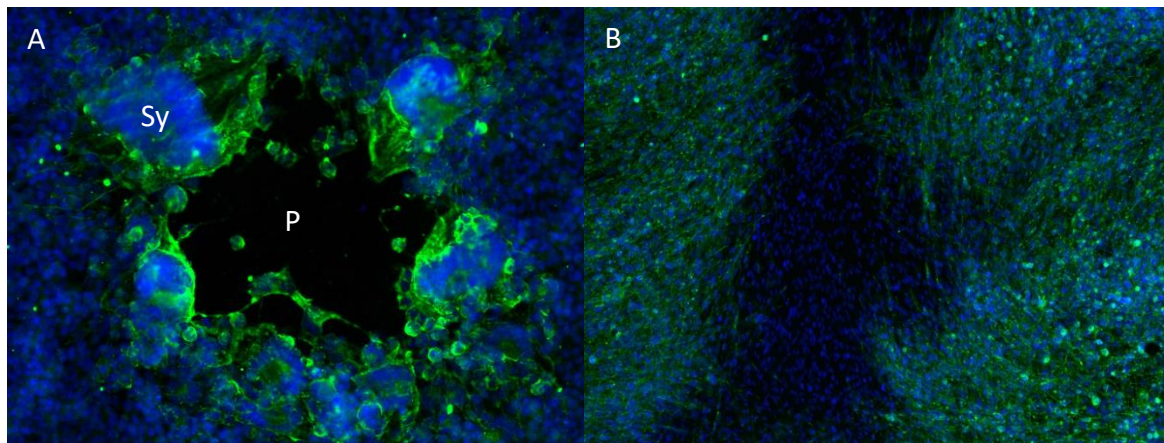


Abb. 12: Immunzytochemie VZV infizierter MeWo und MRC5 Zellen. (A) zeigt die mit pOKA VZV infizierte Melanomzelllinie MeWo mit den für diese Infektion charakteristischen Features von Synzytienbildung (Sy) und Plaquebildung (P) (Vergrößerung 10x). (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012). In (B) wird die pOKA Infektion von der Fibroblastenzelllinie MRC5 dargestellt, welche Flächen bzw. Straßen von Infizierten Zellen zeigt, bei Zell-Zellassoziierter Ausbreitung, und zum Teil zur sphärischen Veränderung der Zellen führt (siehe rechter unterer Bildquadrant). Hier findet sich keine eindeutige Synzytien- bzw. Plaquebildung (Vergrößerung 4x). Kernfärbung DAPI (blau), VZV GlykoproteinE Alexa488 (grün).

3.2.1.1 Virustiterbestimmung

Um eine Vergleichbarkeit der Virusreplikation zwischen den unterschiedlichen Zellkulturen zu gewährleisten, wurde eine Stocksolution mit VZV tragenden MRC5 Zellen angefertigt und die Menge an Infektiosen Einheiten (PFU) bestimmt (Abb. 13). Dabei zeigte die Verdünnungsreihe auf initial konfluenten MeWo Zellen, bei einer Infektion mit 10^{-4} ml der Stocksolution, am dritten Tag nach Infektion die Bildung von 6 Plaques, wohingegen höhere Konzentrationen eine nicht eindeutig definierbare Anzahl an Plaques, bzw. geringere Konzentrationen zu keiner Plaquebildung geführt haben ($n=3$). Somit entsprachen 1ml Stocksolution 6×10^4 PFU.

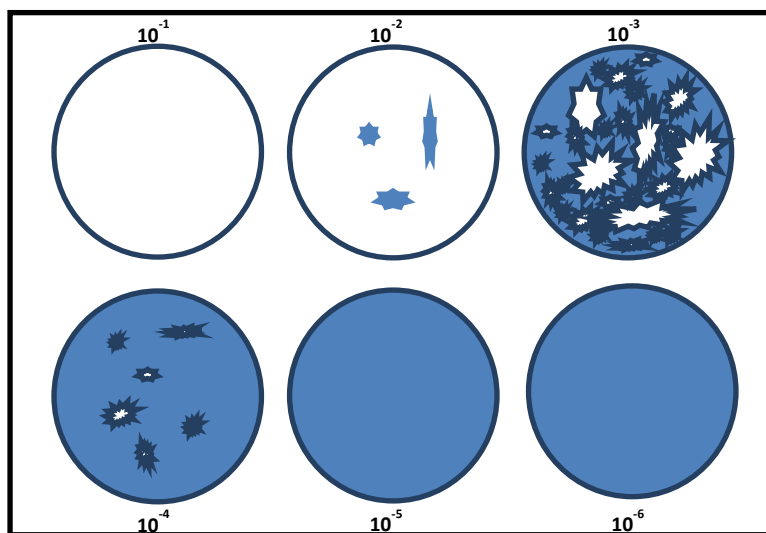


Abb. 13: Schematische Darstellung der Virustiter Bestimmung. 6 well Platte mit konfluenten MeWo Zellen (blau) zeigen in Abhängigkeit der pOKA VZV Konzentration eine Zytolyse (weiß), welcher bei einer Viruskonzentration von 10^{-4} zur Darstellung von 6 Plaques (am dritten Tag nach Infektion) führt und somit einer Konzentration von 6×10^4 Plaque Forming Units (PFU) entspricht.

3.2.1.2 Zytolyseexperiment der Zellshuttle MRC5 und hMSCs nach wt pOKA VZV Infektion

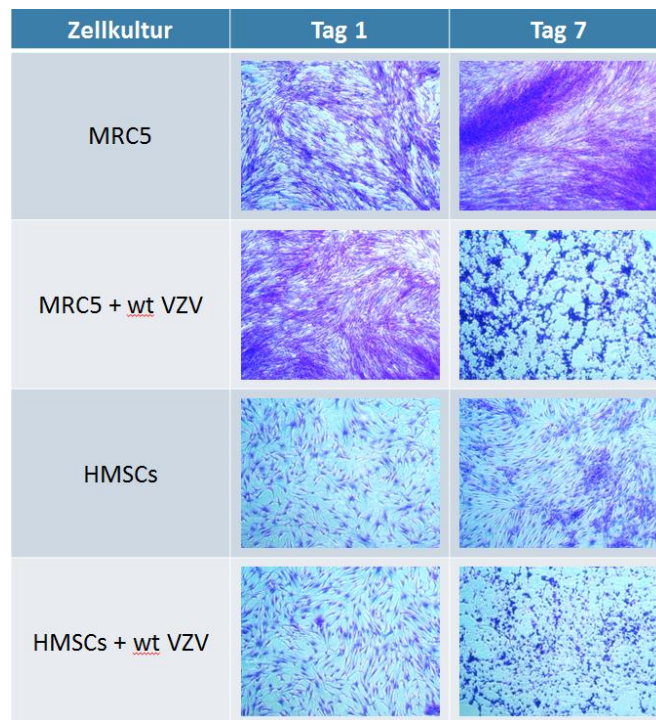


Abb. 14: Infektionsanalyse der Shuttlezellen: Semikonfluente MRC5 Fibroblasten, sowie humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten am 1. Tag nach der pOKA wtVZV Applikation (120 PFU). Nach 7 Tagen sind im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle die Kerne zusammengezogen und verdichtet, mit großen Defekten des Zellrasens (Crystal Violet Färbung, Vergrößerung 4x).

Zur Bestätigung, dass wt pOKA VZV in den humanen Zellen (MRC5, hMSCs) repliziert, welche in den nachfolgenden Experimenten als Virusträger zum Einsatz kamen, wurden diese Zellen 7 Tage lang im Brutschrank kultiviert. Dafür wurden semikonfluente Zellen tragende wells (siehe Abb. 14) mit 120PFU VZV inkubiert. Als Kontrollzellen dienten unbehandelte, also VZV freie, Zellen vom gleichen Zelltyp (Abb. 14 Reihe 1 und 3). Sowohl MRC5 Zellen als auch hMSCs zeigten innerhalb von 7 Tagen eine deutliche Morphologieänderung, mit Plaqueformationen und vereinzelt Synzytien. Die Zellen sahen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, kontrahiert und kaum noch vital aus (Abb. 14 rechts, Reihe 2 und 4).

3.2.2 Morphologische Unterschiede zwischen verschiedenen mit wt pOKA VZV infizierten Zellkulturen

Für die Untersuchung der VZV Replikation in Gliom Zellkulturen wurden die aus Gewebe von malignen diffusen Astrozytomen generierten Primärkulturen (anaplastische Astrozytome: TB22, TB202, TB275, TB372, TB389 und Glioblastome: TB402, TB403, TB414, TB426, TB428, TB458, TB477) und die Gliomzelllinien (U87, U251 und U373) jeweils mit 120 PFU der VZV tragenden MRC5 Zellen 2 Tage lang im Brutschrank kultiviert. Als nicht gliomatöse Zellkultur wurden humanes Epilepsiegewebe (TB397), MRC5, MeWo und hMSCs mit in den Versuch eingeschlossen.

Es zeigten sich - auch im Vergleich zu den MRC5 und den MeWo Zellen - deutlich unterschiedliche Phänotypen zwischen den verschiedenen Zellkulturen. Sämtliche aus Patientengewebe generierten Primärkulturen der malignen diffusen Astrozytome und auch das Epilepsiegewebe (TB397), welches eine längere Latenz als die Tumorzellkulturen besaß (Abb. 15B, TB426), waren permissiv für VZV und zeigten nach VZV Infektion überwiegend ein ähnliches Wachstumsmuster wie die hMSCs (Abb. 15A). Hier fand sich kaum Synzytienbildung, sondern primär ein Zusammenziehen der Einzelzellen mit dünnen fadenförmigen Zwischenzellverbindungen, weshalb wir dieses Muster als „spinnennetzartigen Phänotyp“ bezeichneten.

Demgegenüber standen die Gliomzelllinien (Abb. 15C und D, hier U373). Diese zeigten 2 Tage nach Infektion, neben vereinzelter Synzytienbildung bzw. Plaqueformation, vor allem ein sphärisches Zusammenziehen der Tumorzellen, mit „blumenkohlartigen Formationen“, sodass wir dieses Muster als „blumenkohlartiges Wachstumsmuster“ bezeichneten.

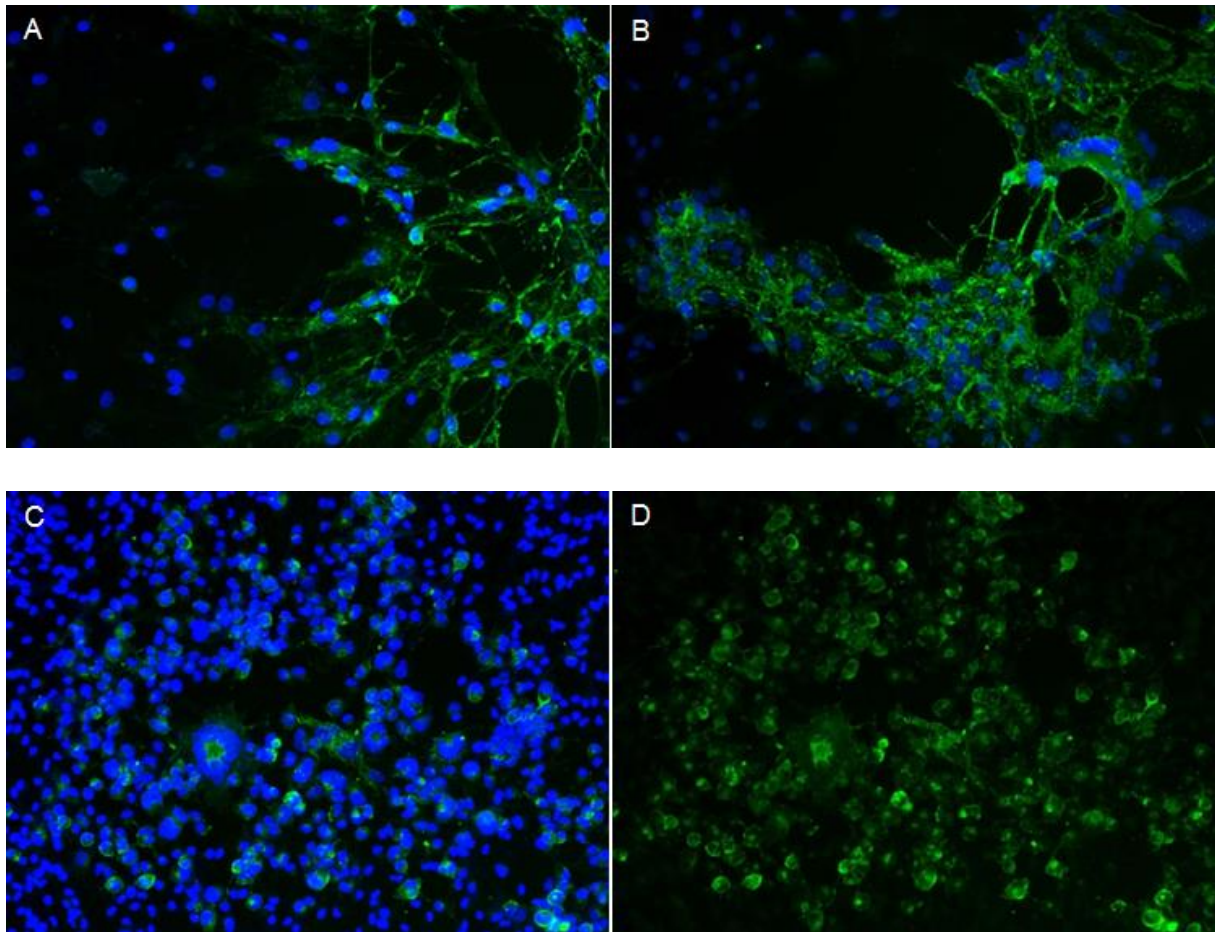


Abb. 15: Immunzytochemischer Vergleich der viralen Ausbreitung VZV infizierter Zellkulturen. Immunfluoreszenzanalyse der Zytomorphologie von pOKA VZV infizierten Primärkulturen und hMSCs. (A) zeigt eine infizierte hMSC Zellkultur und in (B) ist die GBM-Primärkultur TB426 exemplarisch dargestellt. Bei diesen Kulturen finden sich fibrilläre/piloide Verbindungen zwischen den Zellen („viral highways“) ähnlich einem Spinnennetz. (C) und (D) zeigen den gleichen Ausschnitt der Gliomzelllinie U373, bei der die Zellen (wie in (D) verdeutlicht ist (ohne DAPI)) eine sphärische Phänotypänderung nach pOKA VZV Infektion zeigen. Daneben sind ganz vereinzelt angedeutete Synzytienbildungen (Zentrum des Bildes) zu erkennen. Kerne (DAPI, blau), VZV Glykoprotein E (Alexa 488, grün) (Vergrößerung 10x).

3.3 Bestimmung der Aciclovir Konzentration zur Hemmung der Varizella Zoster Replikation

In der Studie von Elion et al. 1977 wurde gezeigt, dass Aciclovir eine inhibierende Wirkung auf die VZV Replikation hat (Elion et al. 1977). Zum Nachweis, dass die phänotypischen Veränderungen innerhalb der Zellkulturen auf die VZV Infektion zurückzuführen sind, wurde in dieser Arbeit der VZV

Replikationshemmer Aciclovir als Kontrollexperiment eingesetzt, um die zytomorphologischen und zytotoxischen Wirkungen von VZV entsprechend zu inhibieren. Um zytotoxische Wirkungen von Aciclovir so gering wie möglich zu halten, wurde die minimal benötigte Konzentration von Aciclovir zur nahezu vollständigen Hemmung der Replikation von VZV in MRC5 Zellen getestet.

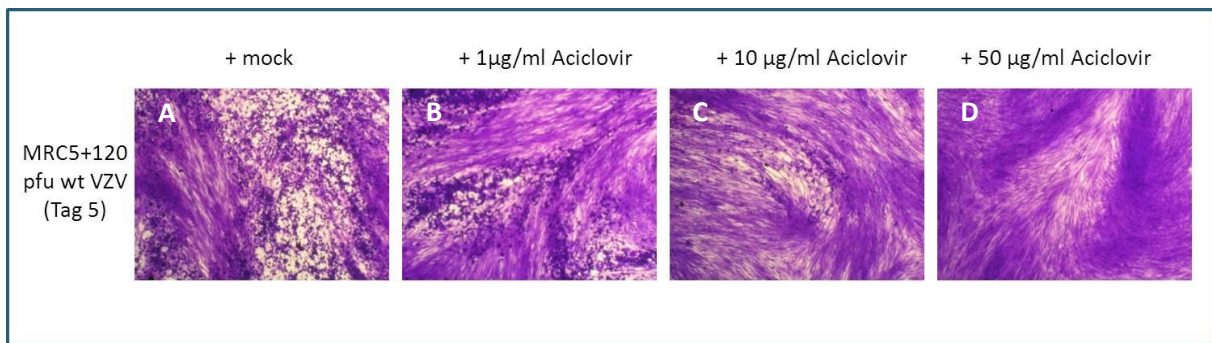


Abb. 16: Inhibitionsreihe der pOKA VZV Replikation in vitro mittels Aciclovir. Die mit 120 PFU behandelte Fibroblastenzelllinie MRC5 wurde, entsprechend der Bilder von links nach rechts, mit (A) mock (PBS) bzw. in aufsteigender Konzentration von (B) 1µg/ml, (C) 10µg/ml oder (D) 50µg/ml Aciclovir, gelöst in PBS, behandelt. Dabei zeigt sich ein dosisabhängiger Verlust der kugelförmigen Zellen mit lediglich sehr vereinzelt Zellen (bei (C) 10µg/ml)- und völligem Fehlen der kugelförmigen Zellen bei Behandlung mit 50µg/ml Aciclovir (Crystal Violet Färbung, Vergrößerung 4x).

Es zeigte sich im Verdünnungsversuch (Abb. 16), dass 10µg/ml Aciclovir zur VZV infizierten (120 PFU) Zellkultur hinzugefügt werden mussten, um die Bildung von viralen Plaques weitgehend zu verhindern. Hier zeigten sich lediglich vereinzelte kugelförmige Zellen. Geringere Aciclovir Konzentrationen zeigten kaum einen replikationsinhibitorischen Effekt. Bei einer Aciclovirkonzentration von 50µg/ml wurden keinerlei morphologisch veränderte Zellen, im Sinne einer viralen Infektion, beobachtet, entsprechend einer vollständigen Hemmung der Replikation von wt VZV.

3.4 Vergleich des Replikationsverhaltens von wt pOKA zwischen den Zellkulturen

Zur Analyse des Replikationsverhaltens der verwendeten VZV Stämme innerhalb der verschiedenen Zellkulturen, wurden semikonfluente Zellen jeweils unbehandelt, mit Aciclovir (10µg/ml), mit VZV (120 PFU) oder mit VZV (120 PFU) und Aciclovir (10µg/ml) versetzt.

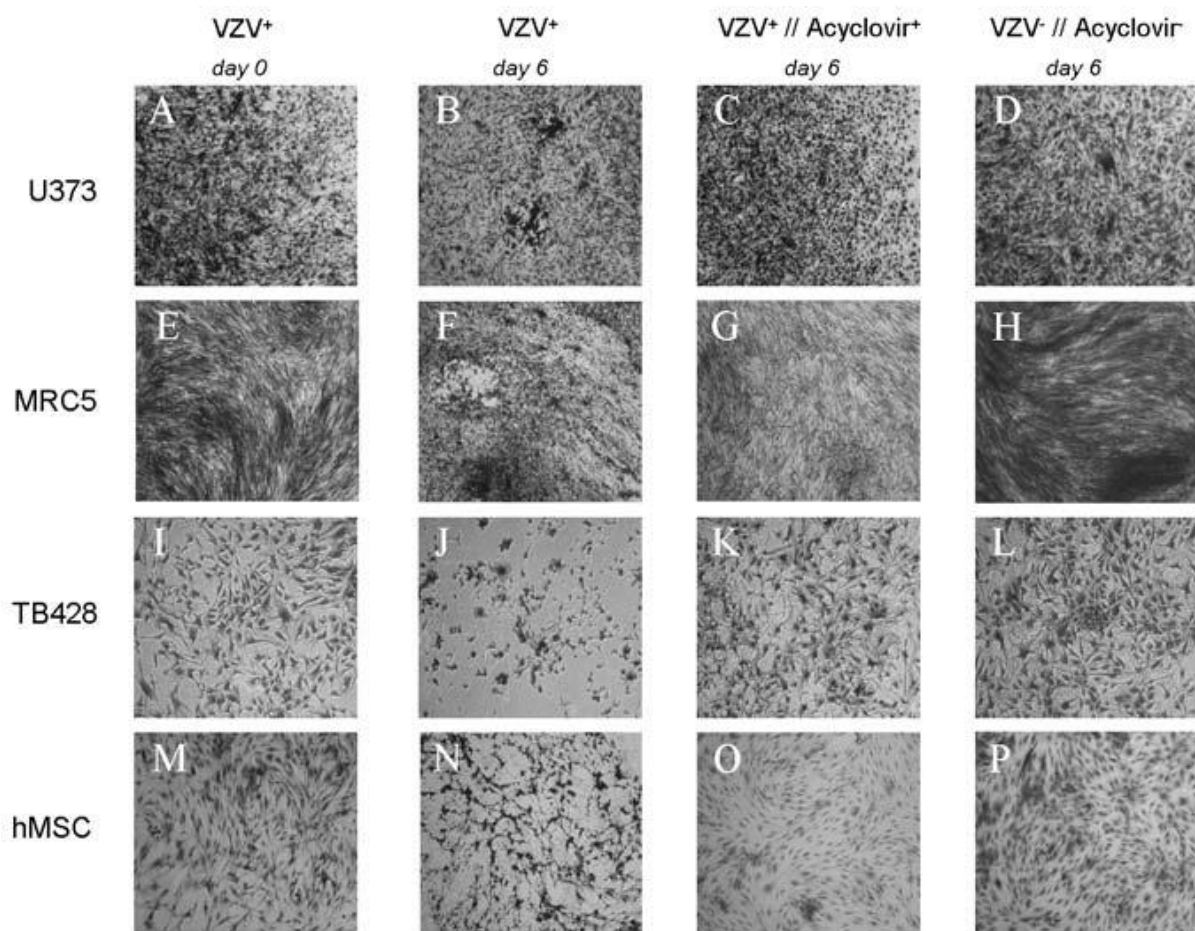


Abb. 17: Zytolyse mittels VZV in vitro. Der Wachstumsvergleich zwischen der Gliomzelllinie U373 (A-D), den als Shuttle verwendeten Zellen MRC5 (E-H) und hMSC (M-O) und der GBM Primärkultur TB428 (I-L) zeigt bereits nach 6 Tagen eine Infektion mit ausgeprägter Zytolyse der Primärkultur (J) und der Trägerzelle hMSC (N). Die mit Aciclovir behandelten Zellen (C, G, K, O) zeigen nahezu keine Virus - assoziierten morphologischen Veränderungen, jedoch scheint die Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur Gruppe (D, H, L, P) etwas reduziert zu sein (Crystal Violet Färbung, Vergrößerung 4x) (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012)).

Bei den Primärkultur-Daten (siehe Abb. 17, anhand von TB428 (I-L) demonstriert) und hMSCs (Abb. 17 M-P) zeigte sich zwischen 6 und 9 Tage nach VZV Infektion ein völliger Zelluntergang bzw. eine völlige Zytolyse (Abb. 17 J, N), gefolgt von MRC5 Zellen (Abb. E-H), welche in diesem Experiment durchschnittlich 11 Tage nach Infektion einen kompletten Zelluntergang zeigten. Gliomzelllinien (U87/ U251 (Daten nicht gezeigt), U373 (Abb. 17 A-D)) waren durchschnittlich nach 15 Tagen von einer kompletten viralen Zytotoxizität betroffen. In unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt) und Zellen, welche lediglich mit Aciclovir versetzt wurden, (Abb. 17 D, H, L, P) fanden sich weder die in VZV Infektionsassays beobachteten viralen Replikationsfoci, noch sonstige Unterschiede zwischen den Gruppen. In Zellen, die mit VZV und Aciclovir behandelt wurden, wurde eine deutlich reduzierte bzw. völlige Hemmung der viralen Plaquebildung beobachtet, jedoch war, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die Zelldichte hier leicht reduziert.

3.5 Virusmutanten Experiment

Um weitere tumorspezifische Selektivität zu untersuchen, wurden die bereits vorhandenen VZV Mutanten pOKA66s, rOKA47ΔC und rOKA/ ORF63rev[T171], welche im Labor von Ann Arvin generiert wurden, in die Wachstumsanalysen aufgenommen und mit Wildtyp pOKA VZV verglichen.

3.5.1 Replikationsgeschwindigkeitsanalyse

Konfluente Zellkulturen von U251, TB402 und TB426 wurden mit 250 PFU der entsprechenden VZV Varianten versehen und maximal 7 Tage inkubiert. Von den Ansätzen der behandelten Zellkulturen wurde täglich (von Tag 2 bis Tag 7) eine Probe asserviert. Anschließend wurden die Zell/ Virus Asservate auf konfluenten MeWo Zellen austitriert. Dabei zeigte sich eine steigende Replikationsgeschwindigkeit bis Tag 4 in allen untersuchten Zellkulturen (siehe Abb. 18). Innerhalb aller Zellkulturen stellte sich das VZV rOKA/ ORF63rev[T171] als das Virus mit der höchsten Replikationsgeschwindigkeit heraus mit ca. ½ lg höherer Replikationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp Virus pOKA VZV. Das VZV pOKA66S zeigte ähnliche Replikationsgeschwindigkeiten in allen getesteten Zellkulturen im Vergleich zum Wildtyp Virus pOKA VZV, wohingegen die Replikationsgeschwindigkeit von rOKA47ΔC im Vergleich zum Wildtyp um ca. 1/3 lg reduziert war. Ab dem 5. Tage nahm die Replikationsgeschwindigkeit aller getesteten Viren wieder deutlich ab.

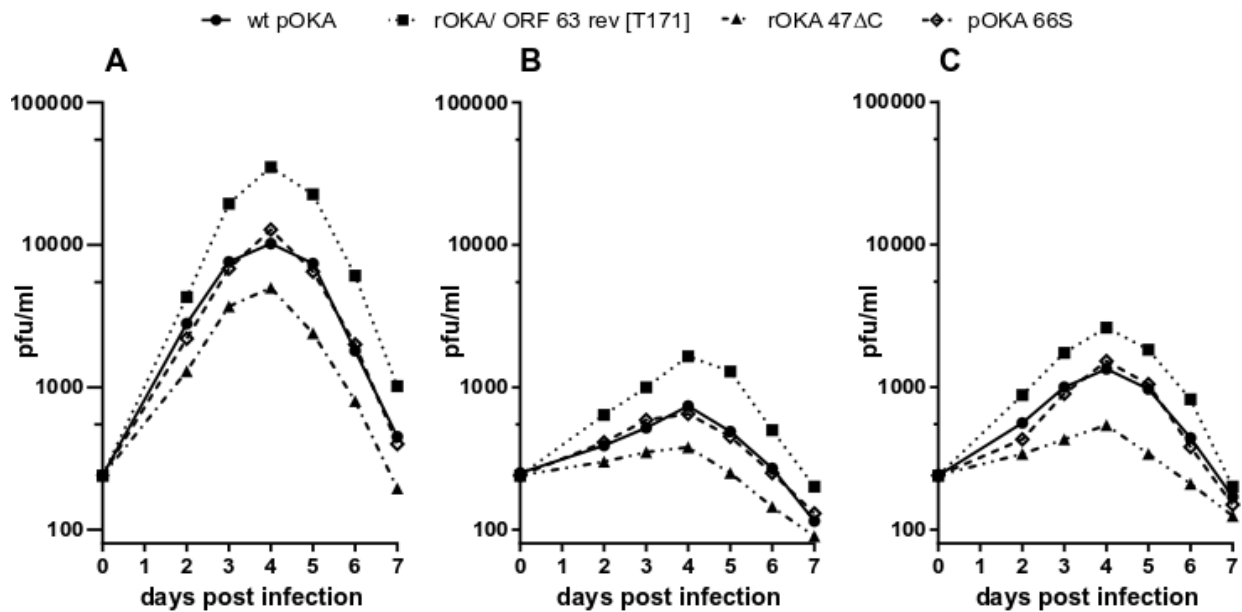


Abb. 18: Replikationsgeschwindigkeitsanalyse. Die Replikationsgeschwindigkeitsanalyse zeigt etwa 4 Tage nach Infektion den größten Titer, welcher anschließend wieder deutlich abnimmt. Der Vergleich zwischen den verschiedenen VZV Viren innerhalb der verschiedenen Zellkulturen U251 (A), TB402 (B) und TB426 (C) zeigt, dass die VZV Mutante rOKA/ ORF63rev[T171] in allen getesteten Zellkulturen eine etwa $\frac{1}{2}$ lg schnellere Replikation zeigt als wt VZV. Die VZV Mutante pOKA66S zeigt hingegen zu wt VZV ein ähnliches Replikationsgeschwindigkeitsverhalten, wohingegen rOKA47ΔC deutlich vermindert ist. Außerdem ist die Replikationsgeschwindigkeit aller Viren deutlich höher in der Gliomzelllinie U251 als in den Primärkulturen, wogegen zwischen diesen beiden kein großer Unterschied in der Replikationsgeschwindigkeit besteht (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012)).

3.5.2 Expression viraler Proteine

Zum Nachweis der Expression viraler Proteine wurden Westernblot Analysen durchgeführt (Abb. 19). Hier zeigte sich, 4 Tage nach Infektion der Gliomzelllinie U251, eine stabile Expression der immediate early (IE), der early (E) und der late (L) VZV Proteine. Wohingegen sich bei den immediate early (IE) Genen ORF4 und ORF63 eine homogene Proteinexpression fand, waren zwischen den VZV Mutanten Unterschiede in der Expression der early (E) Gene zu beobachten. Die Serin / Threonin Kinase ORF47 war stärker exprimiert in den Mutanten rOKA/ ORF63rev[T171] und pOKA66S im Vergleich zum Wildtyp Virus pOKA. Die Serin Threonin Kinase ORF66 fehlte vollständig in pOKA66S aufgrund einer Stop

Mutation innerhalb dieses ORFs. Die Mutante rOKA47 Δ C exprimiert aufgrund ihrer Mutation eine trunkierte Form des ORF47, welche in ein kleineres Fragment dieses Proteins resultierte (siehe Sternchen Abb. 19). Zusätzlich schien bei diesem Virus die Expression des immediate early Gens ORF62, sowie des Glykoproteins E als late Protein, im Vergleich zum Wildtyp pOKA, reduziert zu sein.

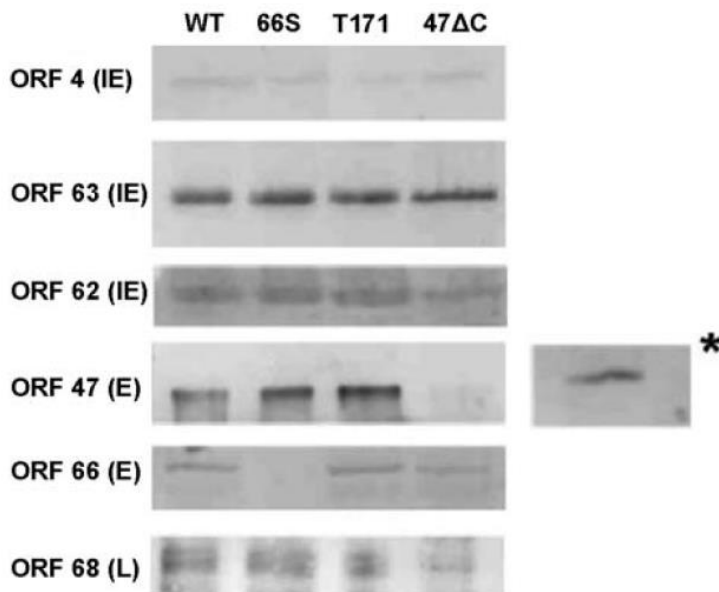


Abb. 19: VZV Proteinexpression. Im Westernblot zeigt sich nach 4-tägiger Infektion der Gliomazelllinie U251 eine homogene Expression der immediate early Gene ORF4 und ORF63 bei allen getesteten Viren. Bei der VZV Mutante rOKA47 Δ C ist das early Gene ORF47 trunkiert, wodurch das Protein ein geringeres Molekulargewicht (siehe Sternchen) besitzt. Bei dieser Mutante ist auch die Expression von ORF62 und des late Gens ORF68 vermindert im Vergleich zum Wildtyp VZV. Die VZV pOKA66S Mutante zeigt eine fehlende Expression von ORF66 und erhöhte Expression der ORF47 Serin - Threonin Kinase, bei ansonsten regelrechter Proteinexpression. Die rOKA/ORF63[T171] Mutante zeigt ebenfalls eine verstärkte Expression dieser Kinase, bei ansonsten regelrechter Proteinexpression (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012)).

3.6 Virusreplikation im dreidimensionalen Modell

Für die Behandlung eines Gliom-Patienten mit onkolytischen Viren ist der Nachweis einer effizienten Virus Replikation innerhalb des dreidimensionalen Tumorgewebes essentiell.

Die dafür generierten Tumorzellsphäroide aus den Primärkulturen wurden mit 240 PFU inkubiert. Bereits nach 4 Tagen zeigte sich eine Expression der viralen Proteine, sowohl an der Oberfläche, als auch

im Zentrum der Sphäroide (Abb. 20). Daneben hatten alle VZV infizierten Sphäroide gemein, dass die Zellkerne nicht mehr regulär geformt, sondern sich viel mehr amorph präsentierten, im Gegensatz zu den nicht mit VZV behandelten Sphäroiden (Abb. 20, hier TB402 NK exemplarisch dargestellt).

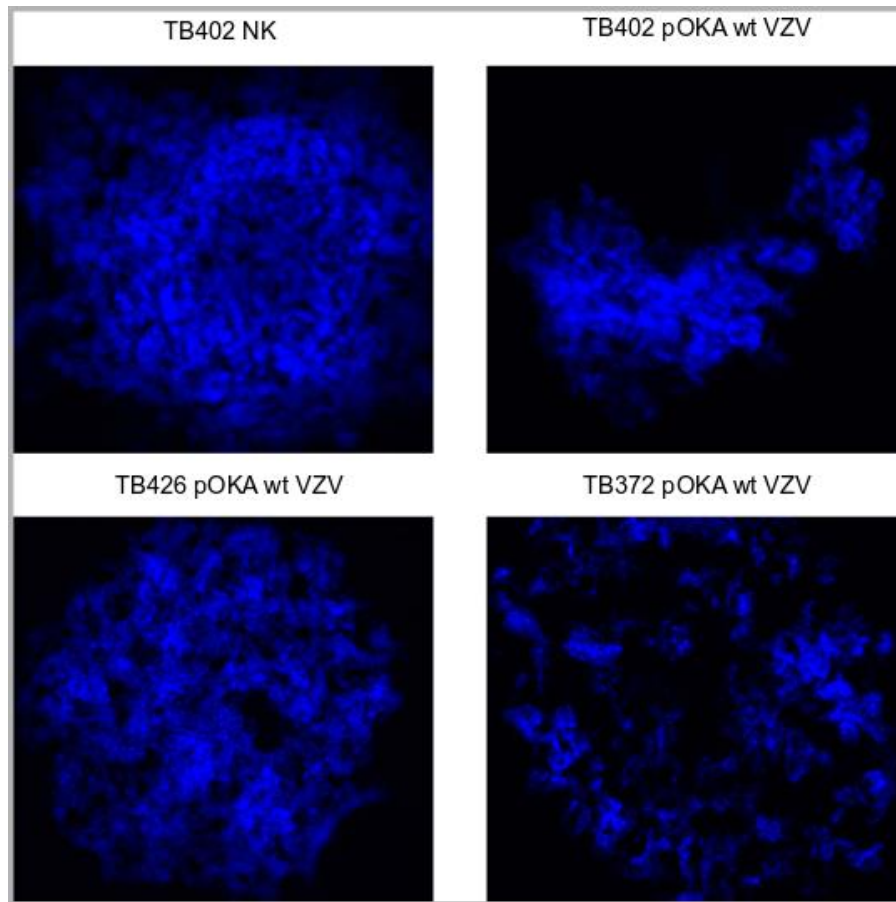


Abb. 20: Kernmorphologieänderung VZV infizierter Zellen. Gefrierschnitte von Zellsphäroiden die aus Primärkulturen (TB402, TB426, TB372), generiert und mit wt pOKA Virus oder unbehandelt (TB402 NK) wurden. Im Gegensatz zur Kontrolle (TB402 NK) stellen sich die Kerne (blau, DAPI) der pOKA wt VZV behandelten Sphäroide aufgelockert, porös, sowie teilweise fragmentiert dar, (Vergrößerung 10x).

Zwischen den verschiedenen Primärkulturen zeigten sich dahingehend Unterschiede, dass sie sich teilweise kohäsiv (TB402, TB372) und teils eher diskohäsiv (TB426, TB372) präsentierten. MRC5 Zellen hingegen stellten sich eher kohäsiv dar.

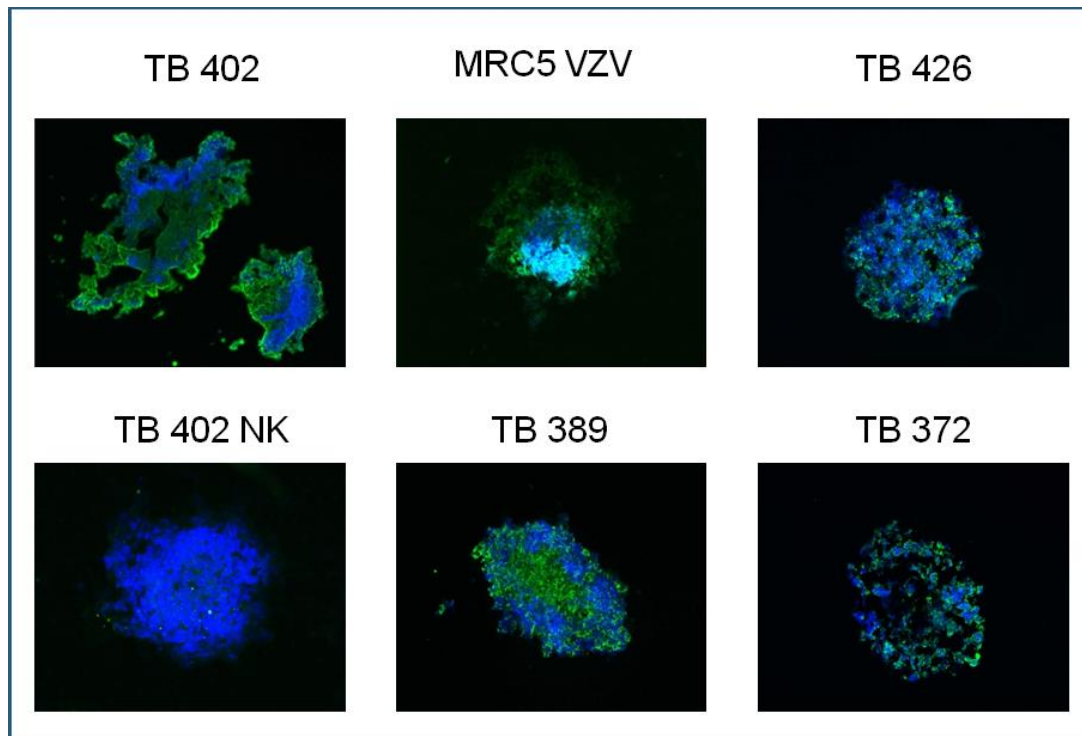


Abb. 21: VZV Ausbreitung im 3D Modell. Gefrierschnitte von Zellsphäroiden die aus Primärkulturen (TB402, TB426, TB389, TB372), sowie der MRC5 Shuttle Zellkultur generiert und mit wt pOKA Virus oder unbehandelt (TB402 NK) wurden. Im Gegensatz zur Kontrolle (TB402 NK) zeigt sich eine Expression von VZV Proteinen (grün) bis in das Zentrum des Sphäroiden, , welche bei der nicht infizierten Kontrolle (TB 402 NK) fehlt (Vergrößerung 10x) (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012)).

3.6.1 hMSC als Gliom attraktiertes Zellshuttle

Neben der Verwendung von tumorspezifischen Viren sind vereinzelte Viren dazu befähigt Zellshuttle zu nutzen, welche z.B. einen natürlichen Tumorzelltropismus besitzen. Damit besteht eine höhere peritumorale Aufenthaltswahrscheinlichkeit und gleichzeitig eine höhere Chance der viralen Infektion des Tumorgewebes.

In 2006 präsentierten Schichor et al., dass hMSCs mit einem solchen Gliom-spezifischen Tropismus ausgestattet sind (Schichor et al. 2006). Daher wurde in der nun vorliegenden Arbeit getestet, ob hMSCs sich als Shuttle für VZV eignen und ihren Tumorzelltropismus auch nach viraler Infektion behalten.

Um hMSCs eindeutig von Gliomzellen unterscheiden zu können, wurden sie in Zellkultur mit Dil markiert. Dabei zeigte sich ein membranständiges und lysosomales (dot like) Anfärbemuster der hMSCs (Abb. 21).

Anschließend wurden hMSC Sphäroide mittels Agar noble Methode generiert (Abb. 23, links Durchlichtmikroskopie, rechts Fluoreszenzmikroskopie).



Abb. 22: Dil markierte hMSCs in vitro. Die für die Konfrontationsexperimente verwendeten hMSCs lassen sich mit Dil (rot) markieren und zeigen ein lysosomales Anfärbemuster (Vergrößerung 40x in (A), (B); Vergrößerung 10X in (C), A, C Fluoreszenzmikroskopie, B Durchlichtmikroskopie).

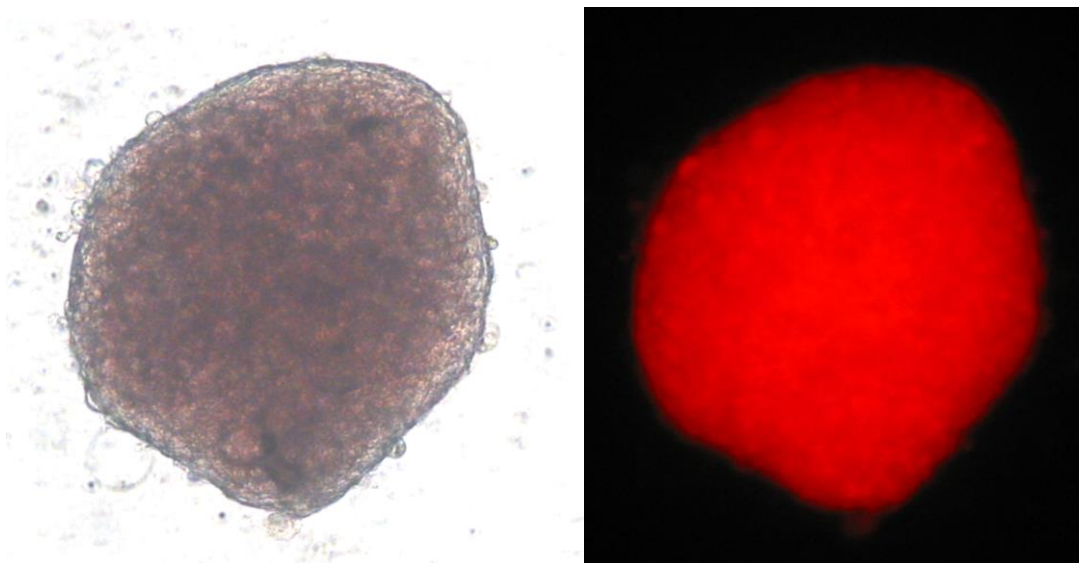


Abb. 23: Dil markierte hMSCs im dreidimensionalen Modell (links Durchlichtmikroskopie, rechts Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 10x).

3.6.1.1 VZV Infektion von hMSC Sphäroiden

Nach Infektion der hMSC Sphäroide mit 120 PFU stellten sich diese teils diskohäsiv dar. In allen Fällen war die Oberfläche unregelmäßig und aufgeraut (Abb. 23) im Vergleich zu den nicht infizierten Sphäroiden (siehe Abb. 23). Außerdem war das Fluoreszenzsignal von Dil deutlich reduziert.

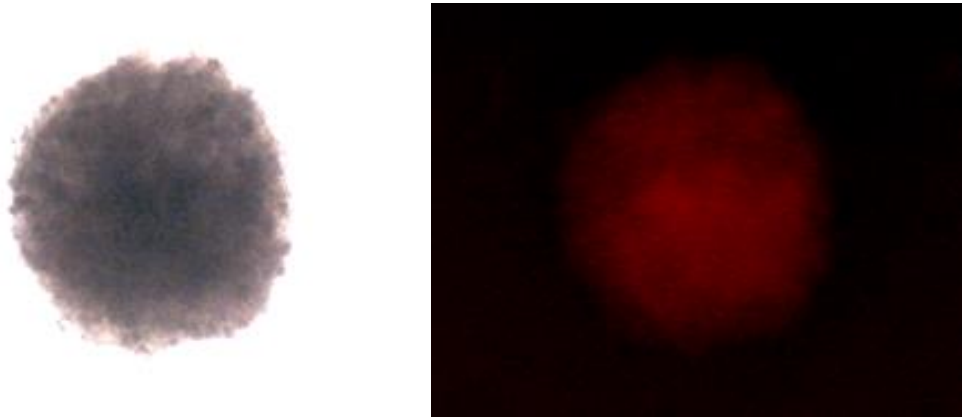


Abb. 24: Morphologieänderung der hMSC Shuttlezellsphäroide nach VZV Infektion. Die aus hMSCs generierten Sphäroide zeigen im 3D Modell die Dil Färbung. Nach VZV Infektion stellen sich die Sphäroide mit einer aufgerauten Sphäroidoberfläche dar und zeigen einen Verlust der Dil Intensität (Vergrößerung 4x) im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle (Abb. 23). (links Durchlichtmikroskopie, rechts Fluoreszenzmikroskopie).

3.6.1.2 Konfrontationsassay

Um die Migrationseigenschaften virusbeladener hMSCs zu Gliomzellen zu untersuchen, wurden die Dil gefärbten und 2 Tage mit 120 PFU inkubierten hMSC Sphäroide mit unbehandelten Tumorzellsphäroiden bzw. unbehandelten MRC5 Sphäroiden, als nicht gliomatöse Kontrolle, Co-kultiviert (Abb. 24). Dabei zeigte sich im Zeitverlauf, dass bereits nach 4 Tagen die virusbeladenen hMSC Zellen die GBM-Sphäroide deutlich umwachsen (TB402) bzw. zum Teil vollständig umschlossen haben (TB426 und TB477), wohingegen sie zu den nicht gliomatösen MRC5 Sphäroiden nur einen sehr bedingten Tropismus zeigten.

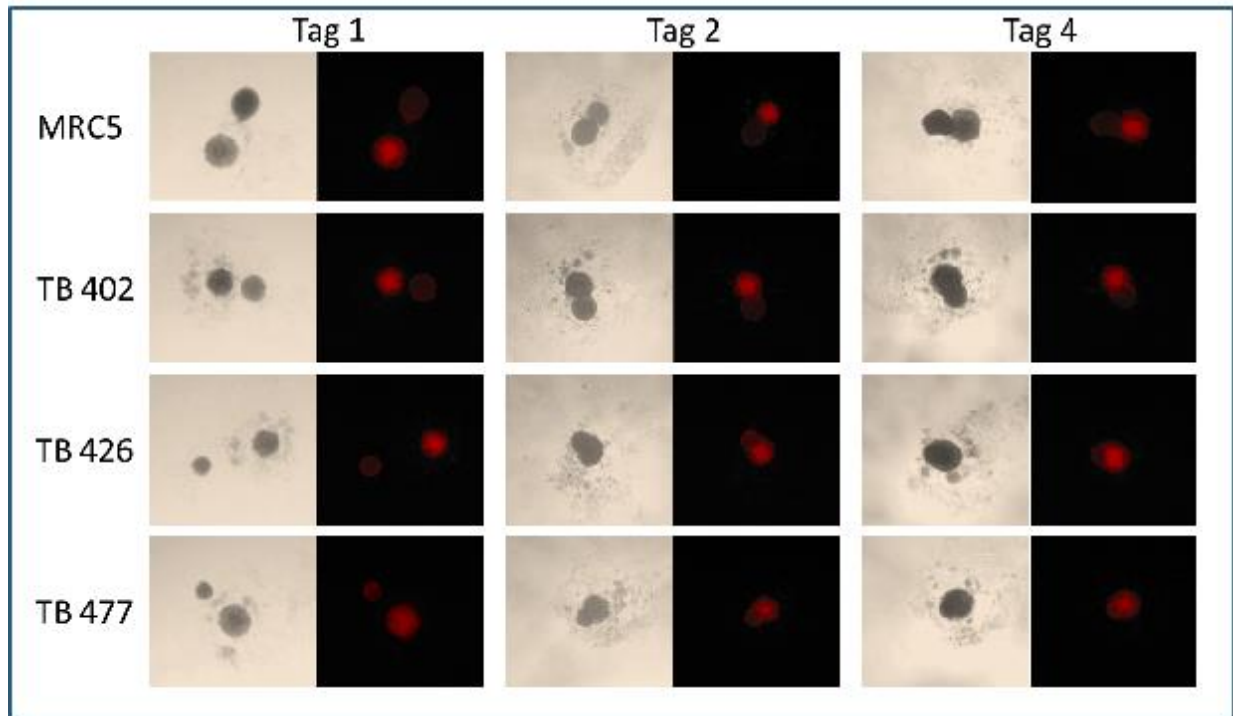


Abb. 25: Migrationseigenschaften der VZV infizierten hMSC Sphäroide. Die mit wt VZV infizierten hMSC Sphäroide wurden mit Sphäroiden der Zellkulturen MRC5, TB402, TB426 und TB477 konfrontiert. Bei den 4 Tage konfrontierten Zellen wird in den Fluoreszenzaufnahmen deutlich, dass die VZV infizierten hMSCs die aus Primärkulturen generierten Zellballen bereits deutlich umwachsen haben, wohingegen sich nur eine geringe Fusion mit dem Zellsphäroid aus den MRC5 Zellen zeigt. (jeweils links Durchlichtmikroskopie, rechts Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 4x)

Auf den immunzytochemischen Schnitten (Abb. 26) zeigte sich nach 7 Tagen Co-Kultivierung, dass VZV Proteine exprimierende (grün) und respektive VZV beladene hMSCs (Dil, rot) bis auf die gegenüberliegende Seite der Tumorzellsphäroide migrierten. Des Weiteren waren Dil ungefärbte Zellen ebenfalls immunzytochemisch positiv für VZV Proteine. Im Gegensatz dazu befanden sich im Konfrontationsexperiment mit dem nicht gliomatösen MRC5 Sphäroid (C) die VZV infizierten hMSCs (rot und grün) lediglich auf der Konfrontationsseite. Hier zeigte sich kein eindeutiges Umwachsen des MRC5 Sphäroids und somit lediglich eine geringe Migrationsaktivität der VZV infizierten hMSCs.

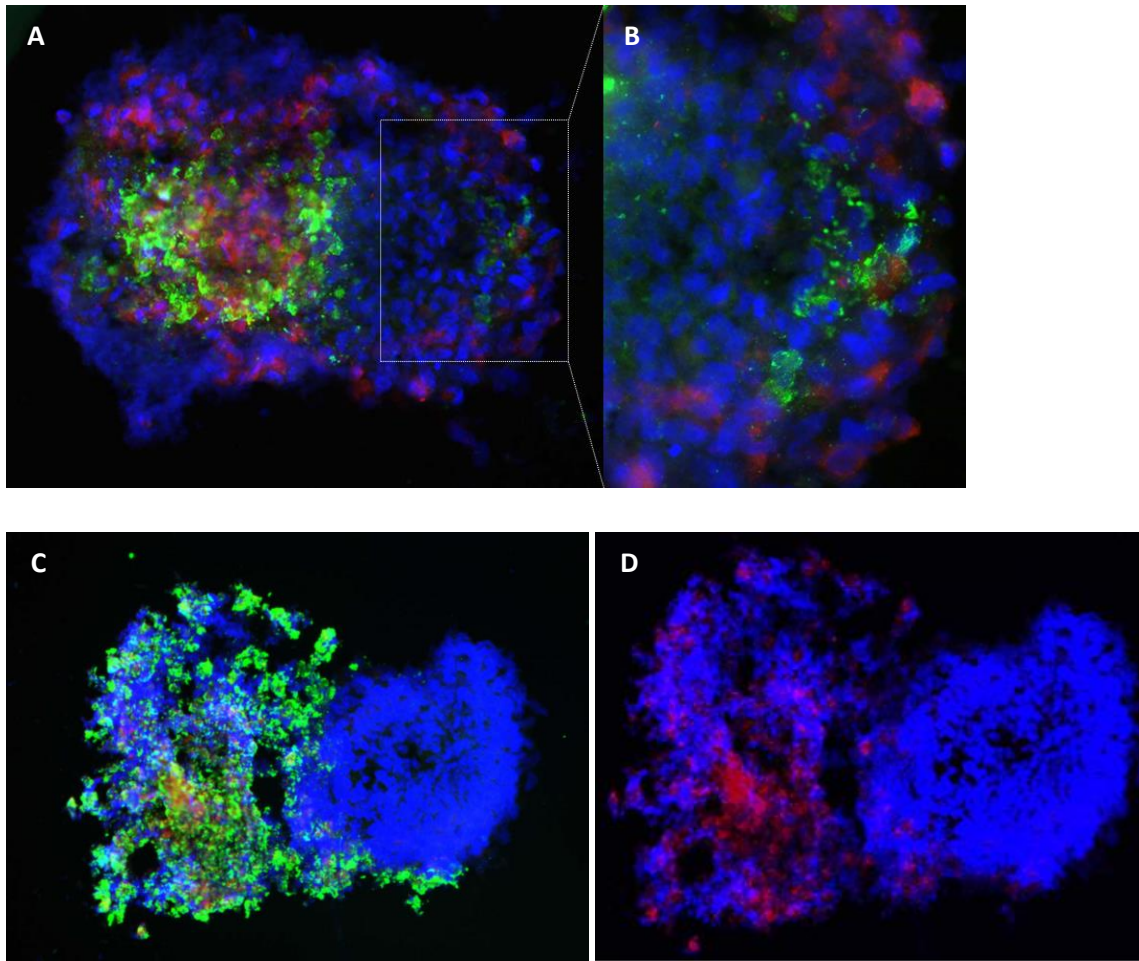


Abb. 26: Immunfluoreszenzanalyse der Migration VZV infizierter hMSC Sphäroide. (A) Kryoschnitte des unter Abb. 25 beschriebenen Konfrontationsassays an Tag 7. Die mit rot markierten hMSCs zeigen eine VZV Proteinexpression (grün). Die nicht mit rot markierten Tumorzellen (TB426) sind vollständig von hMSCs umgeben, welche ebenfalls VZV Proteine exprimieren (rot und grün) (Vergrößerung 10x). (B) Zusätzlich finden sich, in der Vergrößerung verdeutlicht, Zellen, welche nicht rot markiert sind, jedoch immunreaktiv sind für VZV Proteine (grün) (Vergrößerung 40x). (C) Im Gegensatz dazu zeigt sich ein nur geringes Wachstum von VZV infizierten hMSCs um den nicht-gliomatösen MRC5 Kontrollsphäroid (Vergrößerung 10x) (hMSC (rot, Dil), VZV Protein (grün), Kerne (blau, DAPI)). (D) Eine isolierte Darstellung von Dil (rot) und DAPI (blau) zeigt eine weiterhin kräftige Anfärbung der VZV infizierten hMSCs (Vergrößerung 10x). (Angepasst mit Erlaubnis von (Leske et al. 2012)).

3.7 Tumorspezifische Marker

Um die Gliomspezifität zu erhöhen können onkolytische Viren derart manipuliert werden, dass sie sich gliomspezifische Rezeptoren, gliomspezifische Zellprozesse oder bestimmte Promoteraktivitäten zur

Fusion bzw. Replikation zu eigen machen. Daher wurden die in der Literatur beschriebenen Marker CD133 und ASPM an der vorliegenden Kohorte getestet.

Nach magnetic bead sorting für CD133 positive Zellen stellten sich, nach einer Woche Kultivierung, nur ein Teil der Zellen (ca. 10%) in der immunzytochemischen Färbung CD133 positiv dar (Abb. 26).

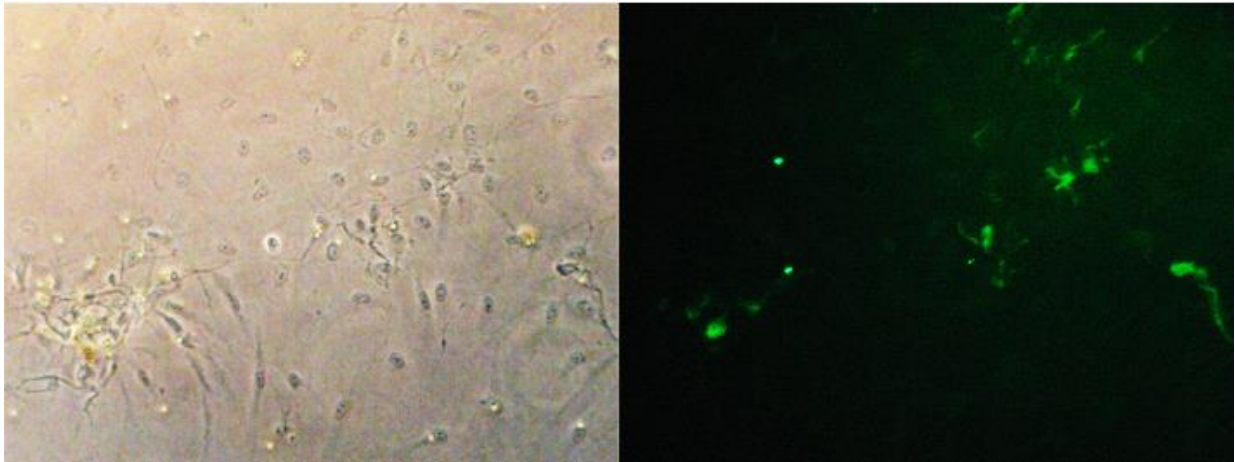


Abb. 27: Immunzytochemie CD133 positiv gesorteter GBM-Primärkultur TB402 (CD133 grün, Vergrößerung 10x).

Des Weiteren wurden die Zellen auf ihre ASPM Expression hin untersucht. Immunzytochemisch fanden sich keine eindeutig nachweisbaren Signale (Daten nicht gezeigt). Im Westernblot fanden sich jedoch schwache Signale für ASPM mit unterschiedlich starker Expression zwischen den verschiedenen Gliom Primärkulturen (Abb. 27). Hierbei stellten sich die Primärkulturen TB402, TB275 und TB389 als diejenigen mit dem stärksten ASPM Signal, TB403, TB414 und TB426 als diejenigen mit einer moderaten- und TB22 und TB477 als die Primärkulturen mit der geringsten bzw. nahezu fehlender Expression für ASPM heraus. Das nicht neoplastische Epilepsiegewebe (TB397) zeigte ebenfalls ein allenfalls sehr schwaches Signal im Westernblot, welches vergleichbar war mit den Tumorkulturen TB22 und TB477.

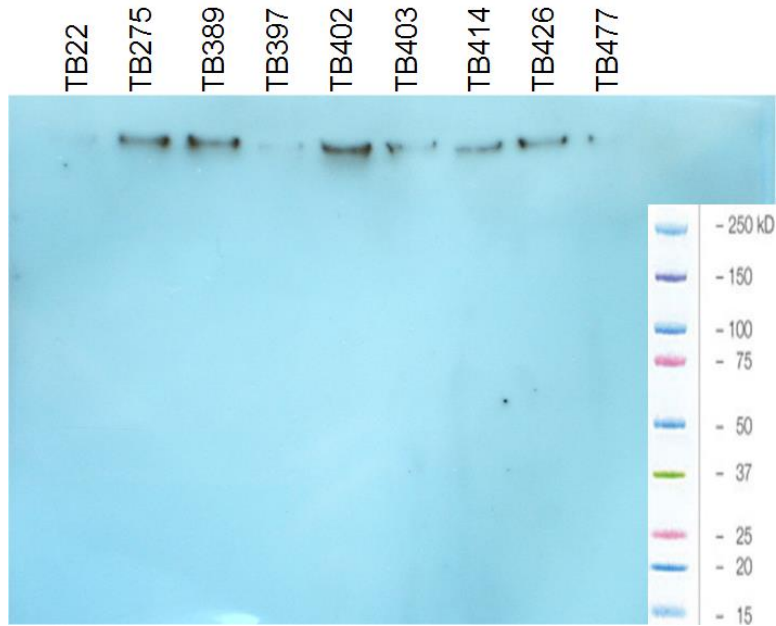


Abb. 28: Westernblotanalyse der ASPM Expression verschiedener Primärkulturen. Zelllysate der verschiedenen Primärkulturen, 30µg Protein pro well elektrophoretisch aufgetrennt, zeigen eine unterschiedliche Intensität des mittels ASPM Antikörper und HRP detektierten Signals. Das Molekulargewicht von ASPM beträgt 410kDa. Proteinstandardgrößen sind rechts in kDa dargestellt.

4 Diskussion

Maligne Gliome besitzen eine sehr heterogene Biologie, welche ein Grund für die schlechten Behandlungsmöglichkeiten dieser Tumore sein könnte.

Die therapeutischen Möglichkeiten zielen zum Einen auf die Tumormassereduktion mittels chirurgischer Operation, die DNA Destruktion durch Strahlentherapie und die chemotherapeutischen Maßnahmen ab, die sich möglichst auf tumorspezifische Eigenschaften beschränken sollten, um den „Normalhirnzellen“ nicht zu schaden (Stupp et al. 2005). Es hat sich gezeigt, dass eine ausgedehnte initiale Tumormassereduktion bei Monotherapie einen geringen prognostischen Benefit für den Patienten liefert, trotz immer weiter verbesserter Technologien und Operationsschemata (Pichlmeier et al. 2008; Sanai and Berger 2008). Einen großen prognostischen Nutzen ziehen die Patienten aus der Radiotherapie (Scott et al. 2011). Diese ist jedoch nur begrenzt möglich, da mit zunehmender Strahlenbelastung das Risiko für ein Hirnödem steigt (Greene-schloesser and Robbins 2012). Als Chemotherapeutikum hat sich das Temozolomid bei Patienten mit Methylierungen im MGMT Gen bewährt, wodurch die Überlebensrate durchschnittlich um 6 Monate gesteigert werden kann (Hegi et al. 2005). Weitere chemotherapeutische Möglichkeiten sind die Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea (CCNU) Behandlung (Wolff 2010; Berges et al. 2014) oder Avastin Gabe, wobei letztgenannte, als chemotherapeutische Maßnahme, momentan mehr und mehr in Verruf kommt, bei fragwürdigem prognostischen Nutzen (Iwamoto et al. 2009; Addeo et al. 2014).

Die alternativen Therapiemethoden erlangen in schwer beherrschbaren Krankheiten eine Bedeutung um „unorthodoxe“ Wege zu nutzen, welche diesen Erkrankungen Einhalt gebieten könnten.

Im Bereich der Gliomtherapie ist eine dieser alternativen Behandlungsmöglichkeiten die Verwendung von sogenannten onkolytischen Viren, welche die primären Tumorzellen abtöten und „Normalzellen“ möglichst nicht schaden sollten.

Dennoch zeigten die bisher in der Glioblastomtherapie verwendeten onkolytischen Viren, bis auf wenige Einzelfälle, keine nennenswerten Erfolge (Wollmann et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde VZV als ein weiterer möglicher Kandidat für etwaige onkolytische Therapieansätze bei Gliom Patienten untersucht.

4.1 VZV infiziert Primärkulturen und Zelllinien maligner Gliomgewebe

Grundvoraussetzung für die onkolytische Wirkung von Viren ist, dass das Virus die Tumorzellen infizieren kann und im Verlauf deren Proliferation hemmt bzw. diese abtötet. Des Weiteren sollte das Virus gleichzeitig innerhalb der Tumorzelle replizieren, damit die Viruslast möglichst hoch gehalten wird, um anschließend weitere Tumorzellen infizieren zu können.

In den *in vitro* Ergebnissen zeigte sich, dass sämtliche Gliomzellen mit VZV infizierbar sind, basierend auf morphologischen Unterschieden zwischen VZV- und unbehandelten Zellen. Diese äußerten sich in Form von „viral Highways“, Morphologieänderung der Zellkerne, den Verlust der Adhärenz der infizierten Zellen zur Zellkulturschale und der Expression viraler Proteine. Damit ist die Grundvoraussetzung für die Nutzung von VZV als onkolytisches Virus erfüllt.

Es fanden sich morphologische Unterschiede zwischen Primärkulturen maligner diffuser Astrozytome und Gliomzelllinien. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis dafür, dass Zelllinien aufgrund verschiedener Faktoren, wie z.B. hoher Passagezahlen oder verändertem Tumormilieu, ihre ursprünglichen tumorcharakteristischen Eigenschaften verlieren bzw. verändern (Sandberg and Ernberg 2005). Daher erscheint die Nutzung von Zelllinien für Grundlagenforschung mit therapeutischem Ansatz zweifelhaft. Dennoch wurden auch diese Zellen von diesem Virus infiziert, mit gleichzeitiger Replikation und stetiger Ausbreitung infizierter Zellen innerhalb der Zellkultur über Zell – Zell vermittelte Kontakte.

4.2 VZV infiziert Zellen im 3D Modell

Die Virusausbreitung innerhalb eines dreidimensionalen Gewebes ist maßgeblich für den therapeutischen Nutzen eines onkolytischen Virus. Eine langsame Ausbreitung kann zur Folge haben, dass die Tumorzellen sich schneller teilen als das Virus sich ausbreiten kann. Dies könnte insbesondere in den attenuierten Stämmen, welche in den bisherigen onkolytischen Herpesviridae verwendet wurden (beispielsweise G207), mit ein Grund für den marginalen therapeutischen Effekt bei diesen Patienten sein, trotz vielversprechender Ergebnisse dieses Virus *in vitro* (Markert et al. 2009). Die Verwendung attenuierter Viren für onkolytische Ansätze ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass unkontrollierte Ausbreitungen zu Herpes simplex Enzephalitiden, mit schwerwiegenden Folgen, bis hin zum Tod, führen können (Jouan et al. 2015). Allerdings wurde in den bisher durchgeführten Studien niemals die

Maximaldosis der injizierten Viren erreicht (Wollmann et al. 2012). Lediglich bei 2 Probanden zeigte sich in der Studie von Markert et al. eine erhöhte Temperatur nach Virusgabe, welche gut kontrollierbar war (Markert et al. 2009).

Auch für VZV sind Enzephalitiden beschrieben worden, welche insbesondere bei älteren und immunsupprimierten Patienten auftreten (Granerod et al. 2010). Daher ist es ratsam im Falle von unvorhergesehenen oder lebensbedrohlichen Nebenwirkungen eine therapeutische Handhabe zu besitzen, um der viralen Ausbreitung entgegenzuwirken, die Viruslast zu minimieren und somit einem weiteren Voranschreiten der unerwünschten viralen Effekte eindämmen zu können.

In dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass der Effekt der viralen Ausbreitung innerhalb der getesteten Primärkulturen und Zelllinien, unter Zuhilfenahme von Aciclovir, *in vitro* minimiert beziehungsweise nahezu gestoppt werden konnte und somit eine gewisse Kontrollierbarkeit des sogenannten „viral spreads“ möglich ist. Außerdem zeigten die dreidimensionalen Tumormodelle in Form von Tumorzellsphäroiden, dass das Virus hier effizient genug ist auch Zellen, welche sich im Zentrum des 3D Modells befinden, zu infizieren und zur Expression viraler Proteine anzutreiben.

Diese Ergebnisse reichen allerdings aus folgenden Gründen nicht aus, um dieses Virus bereits als therapeutisch wirksam zu postulieren. Zum einen handelt es sich bei den Tumorzellsphäroiden um Gebilde, welche einen Durchmesser von ca. 500µm besitzen, wohingegen Gliome mehrere cm groß werden können, sodass gegebenenfalls ein größeres Tumolvolumen eine andere virale Ausbreitungskinetik mit weniger infizierten Tumorzellen zeigen könnte. Zum Zweiten spiegelt ein Glioblastom nicht nur ein Konglomerat von malignen Gliazellen wieder, sondern ist ein komplexes Gebilde, das zusätzlich noch teilweise veränderte Gefäße (Gilbertson and Rich 2007), eingebundene Neurone, sowie mitunter auch nekrotische Anteile aufweist. Ob die virale Ausbreitung auch in diesem Potpourri effizient genug ist, insbesondere mit Bezug auf hypoxische Zellbereiche und nekrotische Areale, bleibt unklar. Der therapeutische Ansatz sieht vor die onkolytischen Viren nach operativer Entfernung der Haupttumormasse mittels infizierter hMSCs in die Operationshöhle einzubringen. Die verbliebenen Tumorzellen, bzw. vereinzelt weiter entfernt gelegene maligne Zellen, sollen daraufhin durch die infizierten hMSCs attrahiert, infiziert und gegebenenfalls abgetötet werden. Somit sind die komplexen Tumorstrukturen innerhalb des GBMs, da operativ entfernt, möglicherweise von minderm Belang. Des Weiteren könnte auch eine lokale Aktivierung des körpereigenen Immunsystems einen therapeutisch positiven Nebeneffekt bringen und im Rahmen der inflammatorischen Prozesse, wie teilweise bei Patienten mit „graft versus tumor“ beschrieben (Porter 2011), zu einer weiteren Reduktion der Tumormasse führen. Da VZV dazu befähigt ist innerhalb von neuronalen Zellen in einen Ruhezustand zu treten und somit nicht vom körpereigenen Immunsystem eliminiert wird (Gilden et al. 1983), müsste

ein solcher Nebeneffekt auch nicht gleichbedeutend sein mit einer völligen Inaktivierung oder gar einem völligen Verlust des Virus.

Ein spekulativer weiterer Vorteil der neuronalen Latenz von VZV könnte folgender hypothetischer Mechanismus darstellen: Gliomzellen, die postoperativ in einen Ruhezustand eingetreten sind und daher mit einer antitumoralen Therapie bis dato nicht erfasst wurden, könnten zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv werden. Wenn sie nun aufgrund des erhöhten Stoffwechsels bzw. aufgrund ihres infiltrativen Verhaltens zu einer Änderung des Milieus innerhalb des Gehirns führen bzw. gar ortsständige Neurone beeinträchtigen, könnte dies gleichzeitig zum Aufkeimen der viralen Infektion führen, wie dies z.B. bei Patienten mit stressinduzierter Ausbildung eines Zosters bekannt ist (Mehta et al. 2004; Harpaz et al. 2015). Dadurch könnte wiederum die Tumorzellausbreitung, gegebenenfalls auch in Zusammenhang mit dem körpereigenen Immunsystem, eingedämmt werden bzw. völlig zum Erliegen kommen.

4.3 VZV Mutante

Die Tatsache, dass auch die nicht neoplastische Primärkultur TB397 von Wildtyp pOKA VZV infiziert wurde, legt nahe, dass dieses Virus einen potentiell entzündlich und gleichsam schädlichen Effekt für nicht-neoplastische Zellen des Gehirns *in vivo* haben könnte. Zwar ist eine kontrollierte entzündliche Reaktion, welche auch lokale nicht neoplastische Zellen mit einschließt, gegebenenfalls sinnvoll, da somit auch diffus infiltrierte und somit resektions-ferner liegende Tumorzellen eher erreicht werden, allerdings birgt es die Gefahr der unkontrollierten Entzündungsreaktion, welche per se zu schwerwiegenden Enzephalitiden, insbesondere bei älteren oder immunsupprimierten Patienten, führen könnte (De Broucker et al. 2012; Becerra et al. 2013). Ein Ansatz, um eine spezifische Tumorselektivität zu erreichen, ist die Möglichkeit das Virus genetisch so zu verändern, dass Normalzellen möglichst nicht infiziert werden, jedoch die Virulenz gegenüber den Tumorzellen aufrecht erhalten bleibt (Singh et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde die Replikationsgeschwindigkeit von verschiedenen Varizella Zoster Viren untersucht, welche jeweils eine genetische Modifikation innerhalb von ORF47, ORF63 oder ORF66 besitzen, und mit dem Wildtyp Virus pOKA VZV verglichen. ORF47 codiert eine für das Virus verzichtbare Serin/ Threonin Kinase, welche physiologischerweise zu einer Phosphorylierung der regulatorischen Proteine und der Glykoproteine führt (Besser et al. 2003). Außerdem wurde beschrieben, dass diese Kinase das immediate early Protein IE62 bindet, welches am Virion-Aufbau beteiligt ist. Die Inaktivierung

bzw. der Verlust von ORF47 ist assoziiert mit einer fehlenden Replikation in T-Zellen und in der Haut (Zerboni et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten auch innerhalb des *in vitro* Experiments, dass hier die Replikationsgeschwindigkeit dieser VZV rOKA47ΔC Virusmutante, die lediglich eine trunkierte und inaktivierte Form des ORF47 kodierten Enzyms bildet (Besser et al. 2003), im Vergleich zu Wildtyp VZV innerhalb der Gliomzellen deutlich reduziert ist und daher in Hinblick auf eine hohe Viruslast als onkolytisches Virus in Gliomen eher ungeeignet erscheint.

Keinen eindeutigen Verlust der Replikationsgeschwindigkeit innerhalb von Gliomzellkulturen zeigte hingegen die zweite Virusmutante, welche unter anderem ein Stopcodon in ORF66 besitzt. Auch bei ORF66 handelt es sich um ein Gen, welches eine für die virale Pathogenese verzichtbare Serin/ Threonin Kinase kodiert. Diese ist für die Phosphorylierung von IE62 verantwortlich. Eine Deletion bzw. Mutation des Kinasemotivs innerhalb von ORF66 führt ebenfalls zu einer Reduktion bzw. Inhibierung der Replikation innerhalb der T-Zellen und in der Haut (Schaap et al. 2005).

Das letzte getestete genetisch veränderte Virus besitzt eine Mutation im ORF63. ORF63 ist zusammen mit ORF71 für die Ausbildung von IE63 verantwortlich. IE63 stellt ein immediate early Gen dar, von dem angenommen wird, dass das dadurch exprimierte Protein essentiell für T-Zell Infektionen ist. Es steuert zum einen die Expression von IE62, zum anderen führt es zur Transaktivierung des zellulären Elongationsfaktor EF1- α . Daneben spielt es eine Rolle in der Dephosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 2 und Downstream der Interferon α Kaskade (Baiker et al. 2004). Wenn Gene von IE62 und IE63 inaktiviert werden, ist die virale Replikation inhibiert. Eine Studie von Baiker et al. hat gezeigt, dass diese Mutante eine schwächere Expression in humanem Hautgewebe besitzt (Baiker et al. 2004).

Interessanterweise hatte diese Mutante innerhalb der Gliomzelllinie U251, sowie innerhalb der Primärkulturen von Glioblastom Geweben, eine um 0,5lg erhöhte Replikationsrate im Vergleich zum Wildtyp VZV Virus. Im Gegensatz dazu wurde von Besser et al. beschrieben, dass dieses Virus eine geringere Replikationsrate und Plaqueformation innerhalb der Melanomzelllinie MeWo zeigt (Besser et al. 2003). Der Grund für die gliomspezifische Erhöhung der Replikationsrate bleibt unklar. Jedoch ist, aufgrund dieser Eigenschaften, diese VZV Mutante ein interessanter Kandidat für den onkolytisch/ therapeutischen Einsatz.

4.4 Humane mesenchymale Stammzellen als Carrier für VZV

Neben den tumorselektiven Eigenschaften, welche durch genetische Manipulationen der Viren erreicht werden können, wurde in dieser Arbeit der Einsatz von Shuttlezellen für die VZV basierte Therapie untersucht. In Schichor et al. wurde beschrieben, dass humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) einen intrinsischen Tropismus zu Gliomzellen zeigen (Schichor et al. 2006).

Sonabend et al. beschrieben, dass mit Adenoviren beladene mesenchymale Stammzellen in der Lage sind diese Viren zu den Gliomzellen zu transferieren (Sonabend et al. 2008).

Diese Technik hat zum einen den Vorteil, dass bisher noch nicht gänzlich verstandene komplexe Mechanismen, die für den Tumorzelltropismus verantwortlich sind, für den therapeutischen Aspekt genutzt werden können, um die Viren in die Nähe von diffus infiltrierten Tumorzellen zu bringen und deren Infektion und Absterben zu triggern.

Des Weiteren ist es denkbar, dass bei Minderexpression der entsprechenden Trägerzelle für virale Proteine eine humorale Antwort reduziert ist, wogegen bei zellfreiem Virus körperfremde Proteine exponiert sind, was die antivirale Immunmaschinerie vermehrt antreiben könnte. Dadurch ist die Chance höher, dass die infizierten Zellen und somit das onkolytische Virus die Gliomzellen erreichen, bevor sie vom körpereigenen Immunsystem abgetötet werden.

Es stellt sich die Frage, ob erstens eine mit VZV infizierte Trägerzelle zur Migration befähigt ist, ob zweitens diese eine Tumorzell-gerichtete Migration zeigt und ob sie letztendlich permissiv ist, um die erreichte Tumorzelle zu infizieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Eigenschaften ebenfalls für mit Wildtyp VZV infizierte hMSCs zutreffen.

Hierbei zeigte sich, dass VZV tragende hMSCs einen deutlich höheren Tropismus um Sphäroide von Primärkulturen maligner diffuser Astrozytome (Gliomsphäroide), aufwiesen, als dies bei dem nicht gliomatösen MRC5 Sphäroid der Fall war. Im Gegensatz zum MRC5 Sphäroid, bei dem die virale Replikation lediglich in direkter Nachbarschaft zum VZV tragenden hMSC Sphäroid stattfand, zeigten die virusinfizierten hMSCs eine nahezu vollständige Migration um den Gliomsphäroid herum bzw. hinein. Ausserdem stellten sich Zellen dar, welche negativ für Dil (rot) waren, jedoch auch eine Immunreaktivität gegen VZV Proteine (grün) aufwiesen. Diese Kombination lässt vermuten, dass eine VZV Infektion von malignen Gliomzellen stattgefunden hat, was selbst an der dem hMSC Sphäroiden abgewandten Seite zu beobachten war. Es ist zwar nicht beweisend für einen selektiven

Tumorzelltropismus von VZV infizierten hMSCs, jedoch machte es eine Präferenz der hMSCs gegenüber des nicht gliomatösen Tumorzellsphäroids in Form von der Fibroblastenzelllinie MRC5 deutlich.

Es ist jedoch anzumerken, dass diese Beobachtungen sich rein auf immunfluoreszenzbasierenden Bildern berufen und nicht durch eine weitere Technik, wie zum Beispiel einer Polymerase Kettenreaktions- (PCR) Analyse, bestätigt wurden. Daher kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer Dil-negativen Zelle, welche virale Proteine exprimiert, auch um eine VZV infizierte hMSC handeln könnte, bei der das Dil-Signal so stark abgeschwächt war, dass es von der Fluoreszenzkamera nicht mehr detektiert werden konnte. Des Weiteren ist es prinzipiell denkbar, dass es auch zum Austausch viraler Proteine zwischen infizierten hMSCs und Gliomzellen gekommen sein könnte, ohne dass ein Austausch von VZV DNA und somit eine Infektion der Zelle stattgefunden hat.

4.5 hMSCs als Gliom unterstützende Zellen?

In mehreren Arbeiten wird diskutiert, ob neben der gliomspezifischen Migration der hMSCs, diese selbst ein Potential zur Entartung und Gliomprogression besitzen (Røsland et al. 2009; Crowder et al. 2013). In diesem Fall wäre ein solcher kombinierter Ansatz unter Zuhilfenahme von hMSCs fragwürdig, da es das Ziel dieser Therapie ist eine Tumorprogression zu verhindern.

Die Ergebnisse, die diesen Umstand belegen sollen, stützen sich primär auf *in vitro* Versuche, welche in Langzeitstudien morphologische Veränderungen der hMSCs aufzeigen. Außerdem wurde ein malignes Potential aufgrund der Tatsache vermutet, dass sich hMSCs in Gefäßwände einbauen können. Diese Ergebnisse sind jedoch aus folgenden Gründen kritisch zu hinterfragen.

Zum einen ist bekannt, dass Zellen, welche lange in Zellkultur gehalten werden, eine genetische Eigendynamik entwickeln und nach einiger Zeit, sowohl genetisch als auch morphologisch, nichts mehr mit den entnommenen Ursprungszellen zu tun haben (Bork et al. 2010; Cassio 2013). Der Grund dafür könnte mitunter an den äußeren Bedingungen liegen. Die Zellen wachsen auf Polystyrol oder Polyethylen und besitzen in der Regel lediglich einen zweidimensionalen Kontakt zu benachbarten Zellen. Zusätzlich werden sie mit Nährmedium versorgt, welches nicht der physiologischen Versorgung entspricht. Biophysiological Prozesse, wie z.B. das Vorhandensein von pulsierenden Gefäßen, fehlen. Der Hauptgrund für eine unkontrollierte „Entartung der Zellen“ dürfte sich jedoch auf die Tatsache gründen, dass keine extrazellulären Kontrollmechanismen in Zellkulturen vorhanden sind, welche entartete Zellen erkennen und entsprechend abtöten, um eine entsprechende Tumorentstehung zu

verhindern. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch humane mesenchymale Stammzellen, welche per se ein pluripotentes Differenzierungspotential besitzen, in Zellkultur entarten können (Serakinci et al. 2014). Daneben konnten andere Studien, die maligne Transformation der hMSCs nicht bestätigen (Tang et al. 2013) bzw. wurde diese Entdeckung teils widerlegt (Prockop 2010).

Zum Zweiten ist wissenschaftlich belegt, dass humane mesenchymale Stammzellen unter anderem auch in der Formation von Blutgefäßen in Tumorgewebe involviert sind (Au et al. 2008). Es bleibt jedoch unklar, ob sie einen neoplastischen Prozess triggern oder reaktiv innerhalb des Tumors zu finden sind (Hong et al. 2014). Maligne Gliome sind in der Bildgebung kontrastmittelanreichernd (Hawighorst et al. 1996). Diese Tatsache gründet sich darauf, dass es in diesen Tumoren zur Neoangiogenese kommt, welche zum Teil keine suffiziente Blut-Hirnschranke ausbilden (Dubois et al. 2014). Daneben kommt es immer wieder zu Mikroinfarkten, welche ebenfalls zum Absterben von Geweben und Endothelien führen. Dass es aufgrund dieser Einblutungen zu Kompensationsmechanismen im Körper kommt, welche zur Abdichtung von undichten Stellen im Blutgefäßsystem führen, ist daher naheliegend und könnte ein Grund für das Einwachsen von hMSCs in Blutgefäße sein und ist im Umkehrschluss dazu nicht notwendigerweise ein Argument für das maligne Potential von hMSCs.

4.6 CD133 als Tumorstammzellmarker?

Es ist nicht ausgeschlossen, dass pluripotenten Stammzellen auch Eigenschaften besitzen, welche die Gliomprogression triggern können. Gerade in Bezug auf die Stammzelltheorien, die mit der Gliomentstehung assoziiert sind, sind Stammzellen diejenigen Zellvektoren, welche näher untersucht werden müssen. Es ist jedoch so, dass sich bislang die „Tumorstammzelle“ innerhalb von Gliomzellen nicht eindeutig definieren ließ. Die in 2004 von Singh et al. veröffentlichte Studie, in der sie CD133 positive Zellen aus Hirntumoren isolierten und mit den über magnetic bead sorting isolierten CD133 negativen Zellen verglichen, warf die Hypothese auf, dass möglicherweise solche Stammzellen existieren (Singh et al. 2004). In dieser Studie genügte bereits die Implantation von 100 CD133 positiven Zellen in Mäuse, um Tumore zu generieren, wohingegen 100.000 CD133 negative Zellen zu keiner Bildung von Tumoren geführt haben. Da CD133 ein Stammzellmarker der hämatopoetischen Zellreihe darstellt, bekräftigte diese Studie den Gedanken der „cancer stem cells“ (CSC), zu Deutsch „Krebsstammzellen“. Dennoch lassen neuere Studien an den Ergebnissen dieser Studie zweifeln. Brescia et al. zeigten 2013, dass CD133 nicht zwangsläufig an der äußeren Zellmembran exprimiert sein muss, sondern es zu unterschiedlichen Zeiten ein Shuttling gibt zwischen der Zelloberfläche und den Zellorganellen (Brescia et al. 2013).

Daher erscheint es zweifelhaft, dass die mittels magnetic bead sorting isolierten CD133 negativen Zellen, welche eine fehlende Expression der Proteine an der Zelloberfläche zeigten, wirklich CD133 negativ waren. Auch im Rahmen dieser Studie fand sich eine rasche Abnahme der CD133 Expression von CD133 positiv gesorteten Zellen, von denen bereits nach 7 Tagen nur noch ca. 10% der Zellen ein CD133 positives Signal an der Zelloberfläche zeigten. Folglich ist es ebenfalls verwunderlich, dass die von Singh et al. Als CD133 negativ gesorteten Zellen zu keiner Tumorentstehung innerhalb der Mäuse geführt haben. Daher ist die These, dass CD133 der kausale Faktor für die Ergebnisse der Arbeit von Singh et al. ist (Singh et al. 2004), stark umstritten.

4.7 Experimente mit Tierversuchen

Zur Evaluation von Techniken, welche gegebenenfalls Anwendung in der humanen Therapie finden, ist es heutzutage Standard Tierversuche zu verwenden, um sowohl die Effizienz der Methode im lebenden Organismus zu untersuchen, als auch auf mögliche Nebenwirkungen, die diese Technik mit sich bringt, vorbereitet zu sein und in diesem Kontext die Methode neu zu evaluieren.

Die Evaluation onkolytischer Effekte durch VZV stellt jedoch in Tiermodellen eine besondere Herausforderung dar, da VZV ein primär humanpathogenes Virus ist. Neben der Replikation in humanen Zellen ist bisher lediglich eine solche in Zellen von Meerschweinchen beschrieben worden, welche hier jedoch keine klassischen VZV assoziierten Krankheitssymptome zeigt und kein Absterben der Zellen generiert (Arvin et al. 1987).

Ein mögliches Tierexperiment an Mäusen mit Hilfe dieses Virus hätte womöglich zur Folge, dass Tiere, welche ein humanes Tumorgewebe bzw. Tumorzellen appliziert bekommen haben, einer solch hohen Viruslast ausgesetzt werden könnten, dass der Tumor gänzlich verschwindet. Dabei bleibt jedoch unklar, ob eine prozentual gemessen vergleichbare Viruslast im Menschen noch symptomfrei oder gar mit dem Leben vereinbar wäre.

Alternative Optionen, die zum Beispiel die Implantation von Tumorzellen sowie von nicht neoplastischem Gewebe innerhalb eines Tieres beinhaltet sind denkbar, um Unterschiede im Infektionsverhalten zwischen den 2 Gewebetypen zu untersuchen. Dennoch ist die Interpretation der Ergebnisse bei diesem Ansatz fraglich, da die Implantation der Gewebe innerhalb der Tiere, sei es operativ-, von der Lokalisation-, oder aber durch das Tier selbst bedingt, allein zu unterschiedlichen Resultaten führen kann.

Außerdem ist ein für eine onkolytische Therapie vorgesehener Gliom Patient ein komplexes biologisches System mit multiplen verschiedenartigen nicht - neoplastischen Gewebsanteilen. Die Wahl nur eines nicht neoplastischen Gewebes als Simulation im Tiermodell als Nicht-Gliomzell - Kontrolle ist daher eher zweifelhaft.

Des Weiteren spiegelt der Tiermodellansatz nicht den eigentlichen Mechanismus wieder, da die Implantation von Tumorgewebe, welche der Applikation von Tumorzellen aus Zellkulturen überlegen ist (Huszthy et al. 2008), mit sehr starken operativen oder interindividuell abhängigen Unterschieden, auch aufgrund von Einblutungen, konfundiert sein könnte.

Neben der Tatsache, dass diese invasiven Techniken ebenfalls einen Einfluss auf das Anwachsen der Gewebe haben können, ist es für diese Art von Versuch unablässig immunkompromittierte Tiere zu verwenden, um keine Host versus Graft Reaktion und damit die Immun getriggerte Abtötung der implantierten Zellen zu erzeugen. Dies entspricht ebenfalls nicht der Situation beim in der Regel immunkompetenten Patienten. In den Tiermodellen würden daher weder das Immunsystem triggernde und gleichzeitig tumorbekämpfende Prozesse beobachtet werden können, noch wären virusdezymierende Vorgänge offensichtlich, welche andererseits die Virusindikation zur onkolytischen Therapie in Frage stellten.

Aufbauend auf diesen Überlegungen sind daher Tierexperimente weniger geeignet. Stattdessen sollten Behandlungsuntersuchungen an Patienten mit einem malignen Gliom in Phase 1 Studien vorgenommen werden.

4.8 ASPM als glioblastomspezifischer Marker?

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass Primärkulturen maligner diffuser Astrozytome den für maligne Gliome als aufreguliert beschriebenen Marker ASPM teilweise exprimierten, wohingegen die nicht neoplastische Primärkultur TB397 eine im Vergleich dazu sehr geringe bzw. keine Expression dieses Markers zeigte. Die Bedeutung dessen bleibt jedoch offen, da auch zwischen den untersuchten Gliom - Primärkulturen eine erhöhte Variabilität der ASPM Expression vorhanden war. Inwiefern dieser Marker daher für die potentielle Therapie mit VZV dient, kann basierend auf den generierten Daten nicht sicher abgeschätzt werden. Weitere nicht neoplastische ZNS Primärkulturen sollten getestet werden, um die Beobachtung der Aufregulation in Tumorzellen bei gleichzeitigem Fehlen in nicht neoplastischem Gewebe zu untermauern. Außerdem muss im Falle einer VZV basierenden Behandlung untersucht

werden, ob allenfalls eine getriggerte Infektion von Zellen, die ASPM vermehrt exprimieren und sich von Ganglien-, T- oder Epithelzellen unterscheiden, zu bisher nicht abschätzbaren Nebenwirkungen führen.

4.9 Möglicher therapeutischer Ansatz

Ein hypothetischer Ansatz der VZV basierenden Gliombehandlung ist in Abb. 29 schematisch dargestellt. Vom Patienten werden hMSCs aus dem Knochenmark gewonnen und diese mit VZV infiziert. Anschließend wird der Patient operiert und die Haupttumormasse neurochirurgisch entfernt. In die nun vorhandene Operationshöhle wird Flüssigkeit, die die VZV infizierten hMSCs enthält eingebracht. Nun könnten die nunmehr verbliebenen infizierten Zellen, welche weiterhin Migrationseigenschaften besitzen, den verbliebenen Tumorzellen hinterherwachsen und diese allenfalls mit VZV infizieren, sodass eine weitere Tumorpherifation eingedämmt wird und die neoplastischen Zellen möglichst abgetötet werden.

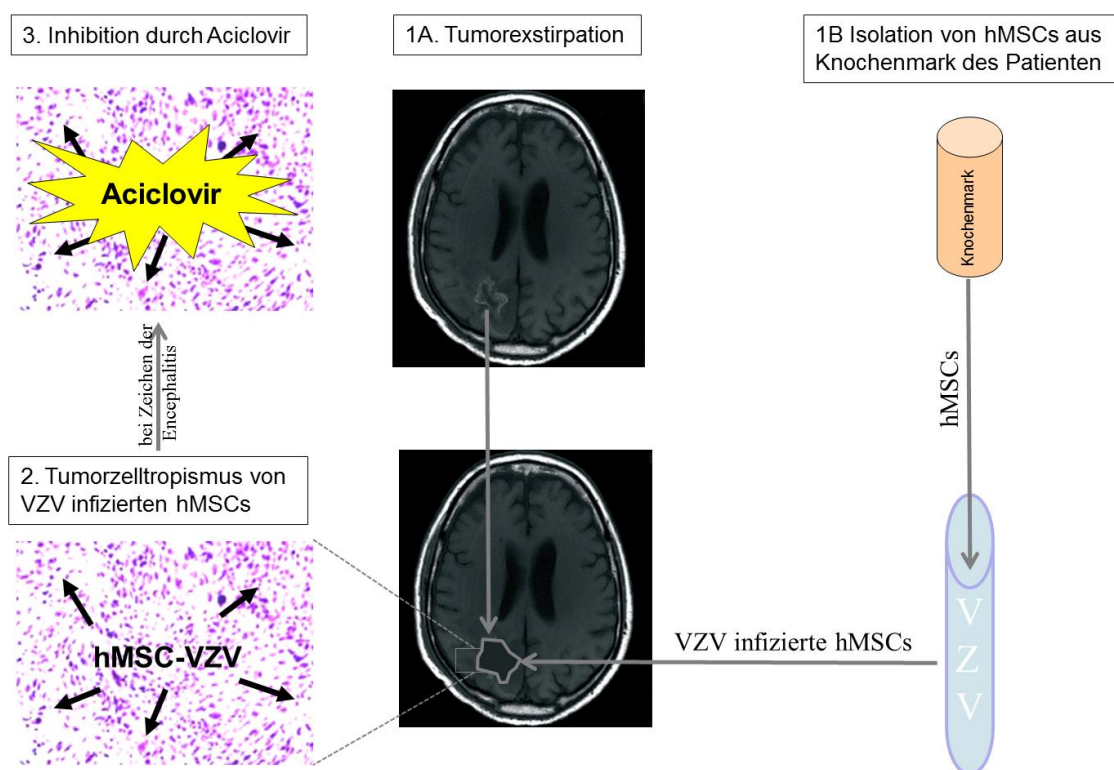


Abb. 29: Schematische Darstellung für einen hypothetischen therapeutischen Ansatz für die VZV-basierte GBM Therapie.

Im Falle einer Enzephalitis bei unkontrollierter VZV Infektion könnten Virostatika wie Aciclovir oder Foscarnet die Virusausbreitung eindämmen und somit eine VZV assoziierte Enzephalitis kontrollieren.

Inwiefern dies in der Praxis umsetzbar ist, wie groß die Effizienz der Methode ist bzw. ob eine solche antivirale Therapie die gewünschten Ergebnisse erzielt, muss in klinischen Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Trotz jahrzehntelanger intensiver Bemühungen und multimodaler Behandlung bleibt die Therapie und Prognose von Patienten mit malignen Astrozytomen bis heute sehr schlecht. Daher könnten gegebenenfalls alternative und unkonventionelle Therapieoptionen Möglichkeiten darstellen, die eine deutliche Verbesserung der Lebenszeit und Lebensqualität mit sich bringen.

Eine dieser unkonventionellen Behandlungsmöglichkeiten ist die Therapie mittels onkolytischer Viren. Es wurden schon mehrere klinische Studien durchgeführt, die diesen Ansatz verfolgten. In diesen Studien wurden Patienten mit genetisch veränderten Viren infiziert, in der Hoffnung, dass aufgrund der viralen Genmanipulation eine Selektivität für die Tumorzellen geschaffen wird und nicht neoplastische Zellen verschont bleiben. Vereinzelte Berichte, bei denen sich eine deutliche Verlängerung der Lebenszeit der behandelten Patienten zeigte wurden zwar publiziert, jedoch blieb der Erfolg bislang hinter den Erwartungen zurück.

In dieser Arbeit wurde das Varizella Zoster Virus, als weiterer möglicher Kandidat zur Behandlung von malignen Astrozytomzellen *in vitro* untersucht. Das Ziel der Studie war die Untersuchung des Potentials von VZV bezüglich der Infektion und Zytolyse von Gliomzellen *in vitro*.

In dieser Arbeit zeigten sich folgende Ergebnisse.

1. Mittels Wildtyp pOKA VZV wurden sowohl die Gliomzelllinien U87, U251 und U373, als auch sämtliche getestete Primärkulturen maligner diffuser Astrozytome infiziert und lysiert. Daneben wurden ebenfalls Melanomzellen der Melanomzelllinie MeWo, sowie die nicht neoplastische Zellkultur TB397, die Fibroblastenzelllinie MRC5 und humane mesenchymale Stammzellen hMSC von VZV befallen. Die Dauer der Zytolyse bzw. die Morphologie nach Infektion war hierbei jedoch unterschiedlich mit schnellem Absterben von hMSCs und Gliom Primärkulturen, welche morphologisch ein „spinnennetzartiges Muster“ zeigten, im Gegensatz zur etwas verzögerten Zytotoxizität von Gliomzelllinien mit „blumenkohlartigem“ Wachstums- bzw. viralem Ausbreitungsmuster.
2. Der Effekt der VZV Infektion bzw. der VZV Ausbreitung konnte mittels Aciclovirgabe (Konzentration von 10µg/ml) gehemmt werden.

3. Neben der 2-dimensionalen Zellkultur konnten auch 3-dimensionale Tumorzellsphäroide mit Wildtyp pOKA VZV infiziert werden. Auch hier zeigte sich, dass die Tumorzellen von außen infiziert werden konnten, die Tumorzellen untereinander permissiv waren und die Geschwindigkeit der Replikation von VZV ausreichte, um auch das Zentrum des Tumorzellkonglomerats zu infizieren.
4. Dil markierte humane mesenchymale Stammzellen, von denen gezeigt wurde, dass sie hinter diffus infiltrierenden Gliomzellen hinterher wachsen können, waren ebenfalls nach Wildtyp pOKA VZV Infektion in der Lage im Konfrontationsassay um die Gliomsphäroide zu wachsen, was beim Sphäroid der MRC5 Fibroblastenzelllinie nicht beobachtet werden konnte. Des Weiteren stellten sich VZV-Protein immunreaktive Zellen, die selbst kein detektierbares Dil Signal besaßen, fernab vom Ort des mit VZV infizierten hMSC Sphäroids dar. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine Infektion der Gliomzellen durch VZV infizierte hMSCs auch nach deren Migration möglich ist.
5. Die Replikationsgeschwindigkeitsanalyse verschiedener VZV Mutante in Gliomkulturen zeigte, dass das VZV *rOKA/ ORF63rev[T171]* die schnellste Replikation von allen getesteten Viren zeigte und selbst das Wildtyp VZV pOKA um 0.5 lg in der Replikationsgeschwindigkeit übertraf.

Folglich ist VZV prinzipiell für die Onkolyse von Gliomzellen geeignet. Mögliche Therapieansätze wären die lokale Behandlung, eventuell unter Zuhilfenahme körpereigener mesenchymaler Stammzellen, welche z.B. mittels VZV *rOKA/ ORF63rev[T171]* infiziert wurden. Allerdings bleibt offen, ob hierfür eine Tumorzellspezifität vorhanden ist, welche das Risiko für eine VZV Enzephalitis minimiert. Der Umstand, dass die nicht neoplastische Zelllinie TB397 von Wildtyp pOKA VZV infiziert werden konnte, zeigt, dass möglicherweise nur attenuierte Viren und nicht das Wildtyp pOKA VZV geeignet sind für eine solche Therapie. Zwar findet sich bei dem getesteten Wildtyp pOKA VZV eine Sensitivität für Aciclovir, jedoch können die Folgen einer hohen intrazerebralen Viruslast basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen nicht sicher abgeschätzt werden. Da dieses Virus lediglich humanpathogen ist, sind Tierversuche diesbezüglich nur bedingt aussagekräftig. Vielmehr müssten Phase 1 Studien durchgeführt werden um die Wirksamkeit und allenfalls die unerwünschten Nebenwirkungen der VZV basierten Gliomtherapie genauer zu untersuchen. Wenn diesbezüglich mehr Sicherheit gewonnen werden kann, könnte dieses Virus ein potentieller Kandidat für eine alternative maligne Astrozytom Therapie darstellen.

6 Referenzen

- Addeo R, Perri F, Parlato C, Della Vittoria G. 2014. ASCO 2013: bevacizumab and glioblastoma – a marriage dissolution? *Curr Med Res Opin.* 30:1871–1873.
- Allen C, Paraskevovou G, Liu C, Iankov ID, Msaouel P, Zollman P, Myers R, Peng KW, Russell SJ, Galanis E. 2008. Oncolytic measles virus strains in the treatment of gliomas. *Expert Opin Biol Ther.* 8:213–220.
- Arvin a. M, Solem SM, Koropchak CM, Kinney-Thomas E, Paryani SG. 1987. Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus glycoprotein gpl and to a non-glycosylated protein, p170, in the strain 2 guinea-pig. *J Gen Virol.* 68:2449–2454.
- Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. 2008. Bone marrow derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood.* 111:4551–4558.
- Baiker A, Bagowski C, Ito H, Sommer M, Zerboni L, Fabel K, Hay J, Ruyechan W, Arvin AM. 2004. The immediate-early 63 protein of Varicella-Zoster virus: analysis of functional domains required for replication in vitro and for T-cell and skin tropism in the SCIDhu model in vivo. *J Virol.* 78:1181–1194.
- Barber GN. 2004. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol.* 17:516–527.
- Becerra JCL, Sieber R, Martinetti G, Costa ST, Meylan P, Bernasconi E. 2013. Infection of the central nervous system caused by varicella zoster virus reactivation: a retrospective case series study. *Int J Infect Dis.* 17:e529–e534.
- Berges R, Baeza-Kallee N, Tabouret E, Chinot O, Petit M, Kruczynski A, Figarella-Branger D, Honore S, Braguer D. 2014. End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma progression and sensitizes to Vinca -alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 5:12769–12787.
- Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. 2009. Clinical Correlates of Herpes Simplex Virus Viremia among Hospitalized Adults. *Clin Infect Dis.* 49:1295–1301.
- Besser J, Sommer MH, Zerboni L, Bagowski CP, Ito H, Moffat J, Ku CC, Arvin a M. 2003. Differentiation of varicella-zoster virus ORF47 protein kinase and IE62 protein binding domains and their contributions to replication in human skin xenografts in the SCID-hu mouse. *J Virol.* 77:5964–5974.
- Bierman HR, Crile DM, Dod KS, Kelly KH, Petrakis NL, White LP, Shimkin MB. 1953. Remissions in leukemia of childhood following acute infectious disease: staphylococcus and streptococcus, varicella, and feline panleukopenia. *Cancer.* 6:591–605.
- Bikeye S-NN, Colin C, Marie Y, Vampouille R, Ravassard P, Rousseau A, Boisselier B, Idbaih A, Calvo CF,

- Leuraud P, Lassalle M, El Hallani S, Delattre J-Y, Sanson M. 2010. ASPM-associated stem cell proliferation is involved in malignant progression of gliomas and constitutes an attractive therapeutic target. *Cancer Cell Int.* 10:1.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams a, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye J a, Sampson-Johannes a, Fattaey a, McCormick F. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 274:373–376.
- Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, Wagner W. 2010. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell.* 9:54–63.
- Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. 2013. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells.* 31:857–869.
- Brown SM, Harland J, MacLean a R, Podlech J, Clements JB. 1994. Cell type and cell state determine differential in vitro growth of non-neurovirulent ICP34.5-negative herpes simplex virus types 1 and 2. *J Gen Virol.* 75 (Pt 9):2367–2377.
- Brown SM, MacLean a R, McKie E a, Harland J. 1997. The herpes simplex virus virulence factor ICP34.5 and the cellular protein MyD116 complex with proliferating cell nuclear antigen through the 63-amino-acid domain conserved in ICP34.5, MyD116, and GADD34. *J Virol.* 71:9442–9449.
- Cassio D. 2013. Long term culture of MDCK strains alters chromosome content. *BMC Res Notes.* 6:162.
- Cello J, Toyoda H, DeJesus N, Dobrikova EY, Gromeier M, Wimmer E. 2008. Growth phenotypes and biosafety profiles in poliovirus-receptor transgenic mice of recombinant oncolytic polio/human rhinoviruses. *J Med Virol.* 80:352–359.
- Chaudhry NS, Shah AH, Ferraro N, Snelling BM, Bregy A, Madhavan K, Komotar RJ. 2013. Predictors of long-term survival in patients with glioblastoma multiforme: advancements from the last quarter century. *Cancer Invest.* 31:287–308.
- Coffey MC, Strong JE, Forsyth P a, Lee PW. 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science.* 282:1332–1334.
- Combs SE, Rieken S, Wick W, Abdollahi A, von Deimling A, Debus J, Hartmann C. 2011. Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: One step forward, and one step back? *Radiat Oncol.* 6:115.
- Corbeil D, Röper K, Hellwig a, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, Simmons PJ, Peault B, Buck DW, Huttner WB. 2000. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 275:5512–5520.
- Crowder SW, Horton LW, Lee SH, McClain CM, Hawkins OE, Palmer AM, Bae H, Richmond A, Sung HJ.

2013. Passage-dependent cancerous transformation of human mesenchymal stem cells under carcinogenic hypoxia. *FASEB J.* 27:2788–2798.
- Csatary LK, Gosztanyi G, Szeberenyi J, Fabian Z, Liszka V, Bodey B, Csatary CM. 2004. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol.*
- Dandy WE. 1928. Removal of Right Cerebral Hemisphere for Certain Tumors with Hemiplegia. *J Am Med Assoc.* 90:823–825.
- Davison a. J, Scott JE. 1986. The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol.* 67:1759–1816.
- De Broucker T, Mailles A, Chabrier S, Morand P, Stahl J-P. 2012. Acute varicella zoster encephalitis without evidence of primary vasculopathy in a case-series of 20 patients. *Clin Microbiol Infect.* 18:808–819.
- De Clercq E. 2013. Antivirals: Past, present and future. *Biochem Pharmacol.* 85:727–744.
- DePace N. 1912. Sulla Scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia.* 9:82–89.
- Dock G. 1904. The Influence of Complicating Diseases Upon Leukaemia. *Am J Med Sci.* 127:563–592.
- Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 75:295–305.
- Dubois LG, Campanati L, Righy C, D'Andrea-Meira I, Spohr TCLDSE, Porto-Carreiro I, Pereira CM, Balça-Silva J, Kahn SA, DosSantos MF, Oliveira MDAR, Ximenes-da-Silva A, Lopes MC, Faveret E, Gasparetto EL, Moura-Neto V. 2014. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci.* 8:418.
- Dworkin RH, Johnson RW, Breuer J, Gnann JW, Levin MJ, Backonja M, Betts RF, Gershon AA, Haanpää ML, McKendrick MW, Nurmikko TJ, Oaklander AL, Oxman MN, Langston DP, Petersen KL, Rowbotham MC, Schmader KE, Stacey BR, Tying SK, Wijck AJM Van, Wallace MS, Wassilew SW, Whitley RJ. 2007. Recommendations for the Management of Herpes Zoster. *Clin Infect Dis.* 44:S1–S26.
- Elion GB, Furman P a, Fyfe J a, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ. 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5716–5720.
- Forsyth P, Roldán G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, Cairncross G, Matthews MV, Markert J, Gillespie Y, Coffey M, Thompson B, Hamilton M. 2008. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Mol Ther.*

16:627–632.

Galanis E, Bateman a, Johnson K, Diaz RM, James CD, Vile R, Russell SJ. 2001. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum Gene Ther.* 12:811–821.

Garber K. 2006. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 98:298–300.

García M a, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:1032–1060.

Geletneký K, Hartkopf AD, Krempien R, Rommelaere J, Schlehofer JR. 2010. Therapeutic implications of the enhanced short and long-term cytotoxicity of radiation treatment followed by oncolytic parvovirus H-1 infection in high-grade glioma cells. *Bioeng Bugs.* 1:429–433.

Geletneký K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, Krebs O, von Knebel Doeberitz M, Huber B, Hajda J. 2012. Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC Cancer.* 12:99.

Georger B, Grill J, Opolon P, Morizet J, Aubert G, Terrier-Lacombe MJ, Bressac De-Paillerets B, Barrois M, Feunteun J, Kirn DH, Vassal G. 2002. Oncolytic activity of the E1B-55 kDa-deleted adenovirus ONYX-015 is independent of cellular p53 status in human malignant glioma xenografts. *Cancer Res.* 62:764–772.

Gilbertson RJ, Rich JN. 2007. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer.* 7:733–736.

Gilden DH, Vafai A, Shtram Y, Becker Y, Devlin M, Wellish M. 1983. Varicella-zoster virus DNA in human sensory ganglia. *Nature.* 306:478–480.

Goetz C, Gromeier M. 2010. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev.*

Gonzalez C, Saunders RD, Casal J, Molina I, Carmena M, Ripoll P, Glover DM. 1990. Mutations at the *asp* locus of *Drosophila* lead to multiple free centrosomes in syncytial embryos, but restrict centrosome duplication in larval neuroblasts. *J Cell Sci.* 96 (Pt 4):605–616.

Goodenberger ML, Jenkins RB. 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet.* 205:613–621.

Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, Cunningham R, Zuckerman M, Mutton KJ, Solomon T, Ward KN, Lunn MP, Irani SR, Vincent A, Brown DW, Crowcroft NS, UK Health Protection Agency (HPA) Aetiology of Encephalitis Study Group. 2010. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective

- study. *Lancet Infect Dis.* 10:835–844.
- Greene-schloesser D, Robbins ME. 2012. Radiation-induced cognitive impairment- from bench to bedside. 37–44.
- Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. 1996. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:2370–2375.
- Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. 2000. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6803–6808.
- Harpaz R, Leung JW, Brown CJ, Zhou FJ. 2015. Psychological Stress as a Trigger for Herpes Zoster: Might the Conventional Wisdom Be Wrong? *Clin Infect Dis.* 60:781–785.
- Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, Brentrup a, Stummer W, Albert FK, Sepehrnia a, Ebel H, Gerss J, Paulus W. 2011. BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 37:803–806.
- Hawighorst H, Schreiber W, Knopp M V, Essig M, Engenhart-Cabilic R, Brix G, van Kaick G. 1996. Macroscopic tumor volume of malignant glioma determined by contrast-enhanced magnetic resonance imaging with and without magnetization transfer contrast. *Magn Reson Imaging.* 14:1119–1126.
- Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner J a, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:997–1003.
- Hellenbrand W, Thierfelder W, Müller-Pebody B, Hamouda O, Breuer T. 2005. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 24:131–135.
- Herrero Y Calle M, Cornelis JJ, Herold-Mende C, Rommelaere J, Schlehofer JR, Geletneky K. 2004. Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer.* 109:76–84.
- Hong I-S, Lee H-Y, Kang K-S. 2014. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? *Mutat Res.* 768:98–106.
- Hoover SE, Cohrs RJ, Rangel ZG, Gilden DH, Munson P, Cohen JI. 2006. Downregulation of varicella-zoster virus (VZV) immediate-early ORF62 transcription by VZV ORF63 correlates with virus replication in vitro and with latency. *J Virol.* 80:3459–3468.
- Horn P a, Tesch H, Staib P, Kube D, Diehl V, Voliotis D. 1999. Expression of AC133, a novel hematopoietic precursor antigen, on acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 93:1435–1437.

- Huszthy PC, Goplen D, Thorsen F, Immervoll H, Wang J, Gutermann a, Miletic H, Bjerkvig R. 2008. Oncolytic herpes simplex virus type-1 therapy in a highly infiltrative animal model of human glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 14:1571–1580.
- Iwamoto FM, Abrey LE, Beal K, Gutin PH, Rosenblum MK, Reuter VE, DeAngelis LM, Lassman a B. 2009. Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology.* 73:1200–1206.
- Jouan Y, Grammatico-Guillon L, Espitalier F, Cazals X, François P, Guillon A. 2015. Long-term outcome of severe herpes simplex encephalitis: a population-based observational study. *Crit Care.* 19:345.
- Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z, Kirschfink M. 1999. Complement resistance of tumor cells: Basal and induced mechanisms. *Mol Immunol.* 36:929–939.
- Kanai R, Zaupa C, Sgubin D, Antoszczyk SJ, Martuza RL, Wakimoto H, Rabkin SD. 2012. Effect of γ 34.5 deletions on oncolytic herpes simplex virus activity in brain tumors. *J Virol.* 86:4420–4431.
- Kanno H, Nishihara H, Narita T, Yamaguchi S, Kobayashi H, Tanino M, Kimura T, Terasaka S, Tanaka S. 2012. Prognostic implication of histological oligodendroglial tumor component: clinicopathological analysis of 111 cases of malignant gliomas. *PLoS One.* 7:e41669.
- Kelly E, Russell SJ. 2007. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther.* 15:651–659.
- Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater a M, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. 2000. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med.* 6:879–885.
- Kreso A, Dick JE. 2014. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell.* 14:275–291.
- Lamont JP, Nemunaitis J, Kuhn J a, Landers S a, McCarty TM. 2000. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann Surg Oncol.* 7:588–592.
- Leske H, Haase R, Restle F, Schichor C, Albrecht V, Vizoso Pinto MG, Tonn JC, Baiker A, Thon N. 2012. Varicella zoster virus infection of malignant glioma cell cultures: a new candidate for oncolytic virotherapy? *Anticancer Res.* 32:1137–1144.
- Li Q, Ali M a., Wang K, Sayre D, Hamel FG, Fischer ER, Bennett RG, Cohen JL. 2010. Insulin degrading enzyme induces a conformational change in varicella-zoster virus gE, and enhances virus infectivity and stability. *PLoS One.* 5.
- Liu T-C, Galanis E, Kirn D. 2007. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a

- decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol.* 4:101–117.
- Logan C V, Lucke B, Pottinger C, Abdelhamed Z a, Parry D a, Szymanska K, Diggle CP, van Riesen A, Morgan JE, Markham G, Ellis I, Manzur AY, Markham AF, Shires M, Helliwell T, Scoto M, Hübner C, Bonthron DT, Taylor GR, Sheridan E, Muntoni F, Carr IM, Schuelke M, Johnson C a. 2011. Mutations in MEGF10, a regulator of satellite cell myogenesis, cause early onset myopathy, areflexia, respiratory distress and dysphagia (EMARDD). *Nat Genet.* 43:1189–1192.
- Lorence RM, Katubig BB, Reichard KW, Reyes HM, Phuangsab A, Sassetti MD, Walter RJ, Peeples ME. 1994. Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res.* 54:6017–6021.
- Lorence RM, Rood P a, Kelley KW. 1988. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of its cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst.* 80:1305–1312.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC.
- Lun X, Senger DL, Alain T, Oprea A, Parato K, Stojdl D, Lichty B, Power A, Johnston RN, Hamilton M, Parney I, Bell JC, Forsyth P a. 2006. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV??M51) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst.* 98:1546–1557.
- Markert JM, Liechty PG, Wang W, Gaston S, Braz E, Karrasch M, Nabors LB, Markiewicz M, Lakeman AD, Palmer C a, Parker JN, Whitley RJ, Gillespie GY. 2009. Phase Ib Trial of Mutant Herpes Simplex Virus G207 Inoculated Pre-and Post-tumor Resection for Recurrent GBM. *Mol Ther.* 17:199–207.
- Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer C a, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. 2000. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 7:867–874.
- Markert JM, Razdan SN, Kuo H-C, Cantor A, Knoll A, Karrasch M, Nabors LB, Markiewicz M, Agee BS, Coleman JM, Lakeman AD, Palmer CA, Parker JN, Whitley RJ, Weichselbaum RR, Fiveash JB, Gillespie GY. 2014. A Phase I trial of Oncolytic HSV-1, G207, Given in Combination with Radiation for Recurrent GBM demonstrates Safety and Radiographic Responses. *Mol Ther.* 22:1048–1055.
- Mehta SK, Cohrs RJ, Forghani B, Zerbe G, Gilden DH, Pierson DL. 2004. Stress-induced subclinical reactivation of varicella zoster virus in astronauts. *J Med Virol.* 72:174–179.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan D a, Zhu S, Dia EQ, Lu K V, Yoshimoto K, Huang JHY, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhir R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. 2005. Molecular determinants of

- the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 353:2012–2024.
- Merrill MK, Bernhardt G, Sampson JH, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gromeier M. 2004. Poliovirus receptor CD155-targeted oncolysis of glioma. *Neuro Oncol.* 6:208–217.
- Moffat J, Ito H, Sommer M, Taylor S, Arvin AM. 2002. Glycoprotein I of Varicella-Zoster Virus Is Required for Viral Replication in Skin and T Cells. *Society.* 76:8468–8471.
- Moore AE. 1952. Viruses With Oncolytic Properties and Their Adaptation To Tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 54:945–952.
- Muller P a J, Vousden KH. 2013. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 15:2–8.
- Nagpal S, Harsh G, Recht L. 2011. Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemother Res Pract.* 2011:602812.
- Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RGW, Hoadley K a., Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K. 2010. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell.* 17:510–522.
- O’Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, Boyle L, Pandey K, Soria C, Kunich J, Shen Y, Habets G, Ginzinger D, McCormick F. 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 6:611–623.
- Ohgaki H. 2004. Genetic Pathways to Glioblastoma: A Population-Based Study. *Cancer Res.* 64:6892–6899.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:479–489.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol.* 170:1445–1453.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2013. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 19:764–772.
- Oliver SL, Brady JJ, Sommer MH, Reichelt M, Sung P, Blau HM, Arvin a M. 2013. An immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif in varicella-zoster virus glycoprotein B regulates cell fusion and skin pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:1911–1916.
- Ozaki T, Asano Y. 2016. Development of varicella vaccine in Japan and future prospects. *Vaccine.* 34:3427–3433.

- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I-M, Gallia GL, Olivi a., McLendon R, Rasheed B a., Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam D a., Tekleab H, Diaz L a., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* (80-). 321:1807–1812.
- Pattison L, Crow YJ, Deeble VJ, Jackson a P, Jafri H, Rashid Y, Roberts E, Woods CG. 2000. A fifth locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 1q31. *Am J Hum Genet*. 67:1578–1580.
- Perry J, Chambers a, Spithoff K, Laperriere N. 2007. Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol*. 14:189–194.
- Pichlmeier U, Bink a., Schackert G, Stummer W. 2008. Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro Oncol*. 10:1025–1034.
- Porter DL. 2011. Allogeneic immunotherapy to optimize the graft-versus-tumor effect: concepts and controversies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011:292–298.
- Prockop DJ. 2010. Defining the probability that a cell therapy will produce a malignancy. *Mol Ther*. 18:1249–1250.
- Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M. 2000. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther*. 7:859–866.
- Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 69:5331–5339.
- Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M, zur Hausen H. 1998. Replication of ONYX-015, a Potential Anticancer Adenovirus, Is Independent of p53 Status in Tumor Cells. *J Virol*. 72:9470–9478.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. 2005. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med*. 353:811–822.
- Sanai N, Berger MS. 2008. Glioma Extent of Resection and Methods. *Neurosurgery*. 62:753–766.
- Sandberg R, Ernberg I. 2005. Assessment of tumor characteristic gene expression in cell lines using a

- tissue similarity index (TSI). *Proc Natl Acad Sci.* 102:2052–2057.
- Schaap-Nutt A, Sommer M, Che X, Zerboni L, Arvin AM. 2006. ORF66 Protein Kinase Function Is Required for T-Cell Tropism of Varicella-Zoster Virus In Vivo. *J Virol.* 80:11806–11816.
- Schaap A, Fortin J-F, Sommer M, Zerboni L, Stamatis S, Ku C-C, Nolan GP, Arvin AM. 2005. T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J Virol.* 79:12921–12933.
- Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn J-C, Goldbrunner R. 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol.* 199:301–310.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Xy L, Dt J, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Am F. 2012. Driver mutations in histone H3 . 3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma . *Cancer genomics : Histone modification at the gene level . [Nat Rev Genet . 2012] Histone modification at the gene level . [Nat Rev Cancer . 2012].* 482:22286061.
- Scott J, Tsai Y-Y, Chinnaiyan P, Yu H-HM. 2011. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 81:206–210.
- Semler BL. 2004. Poliovirus proves IRES-istible in vivo. *J Clin Invest.* 113:1678–1681.
- Sen N, Che X, Rajamani J, Zerboni L, Sung P, Ptacek J, Arvin a. M. 2012. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zoster virus promote replication and skin pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 109:600–605.
- Serakinci N, Fahrioglu U, Christensen R. 2014. Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. *Eur J Cancer.* 50:1522–1530.
- Singh PK, Doley J, Kumar GR, Sahoo AP, Tiwari AK. 2012. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian J Med Res.* 136:571–584.
- Singh S, Hawkins C, Clarke ID, Squire J a. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 432:396–401.
- Sinkovics JG, Horvath JC. 2000. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol.* 16:1–15.
- Soeda a, Park M, Lee D, Mintz a, Androutsellis-Theotokis a, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam a B, Pollack IF, Park DM. 2009. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene.* 28:3949–3959.
- Sonabend AM, Ulasov I V, Tyler M a, Rivera A a, Mathis JM, Lesniak MS. 2008. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells.* 26:831–841.

- Soussi T, Wiman KG. 2007. Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell*. 12:303–312.
- Southam CM, Moore AE. 1951. West Nile, Ilheus, and Bunyamwera Virus Infections in Man. *Am J Trop Med Hyg*. s1-31:724–741.
- Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P, Lee PWK. 1998. The molecular basis of viral oncolysis: Usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *EMBO J*. 17:3351–3362.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. 2005. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 352:987–996.
- Tang Q, Chen Q, Lai X, Liu S, Chen Y, Zheng Z, Xie Q, Maldonado M, Cai Z, Qin S, Ho G, Ma L. 2013. Malignant transformation potentials of human umbilical cord mesenchymal stem cells both spontaneously and via 3-methylcholanthrene induction. *PLoS One*. 8:2–9.
- Tatsis N, Ertl HCJ. 2004. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 10:616–629.
- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. 2014. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 23:1985–1996.
- Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, Johnson P a. 2001. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:6396–6401.
- Turnell a S, Grand RJ, Gallimore PH. 1999. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol*. 73:2074–2083.
- Ventoso I, Berlanga JJ, Almendral JM. 2010. Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol*. 84:5043–5051.
- Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 137:413–431.
- Wang L, Oliver SL, Sommer M, Rajamani J, Reichelt M, Arvin AM. 2011. Disruption of pml nuclear bodies is mediated by orf61 sumo-interacting motifs and required for varicella-zoster virus pathogenesis in skin. *PLoS Pathog*. 7.
- Wang L, Rajamani J, Sommer M, Zerboni L, Arvin AM. 2013. Identification of a hydrophobic domain in varicella-zoster virus ORF61 necessary for ORF61 self-interaction, viral replication, and skin pathogenesis. *J Virol*. 87:4075–4079.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. 2009. IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am J Pathol*. 174:1149–1153.

- Weitzman MD. 2005. Functions of the adenovirus E4 proteins and their impact on viral vectors. *Front Biosci.* 10:1106.
- Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, Shi ZQ, Johnston RN, Nishikawa S, Lee PW, Forsyth P a. 2001. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst.* 93:903–912.
- Wingren C, James P, Borrebaeck C a K. 2009. Strategy for surveying the proteome using affinity proteomics and mass spectrometry. *Proteomics.* 9:1511–1517.
- Wolff J. 2010. HIT-GBM-D (Deutsch) Studien Protokoll 2. Ausgabe •. lulu.com.
- Wollmann G, Ozduman K, van den Pol AN. 2012. Oncolytic Virus Therapy for Glioblastoma Multiforme. *Cancer J.* 18:69–81.
- Wollmann G, Rogulin V, Simon I, Rose JK, van den Pol AN. 2010. Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. *J Virol.* 84:1563–1573.
- Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, Zhu X, Qu C, Chen X, Zhang J, Easton J, Edmonson M, Ma X, Lu C, Nagahawatte P, Hedlund E, Rusch M, Pounds S, Lin T, Onar-thomas A, Huether R, Kriwacki R, Parker M, Gupta P, Becksfort J, Wei L, Heather L, Boggs K, Vadodaria B, Yergeau D, Russell JC, Fulton RS, Fulton LL, Jones C, Boop F a, Broniscer A, Wetmore C, Gajjar A, Ding L, Mardis ER. 2014. NIH Public Access. 46:444–450.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. 2009. Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 360:765–773.
- Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM. 2014. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 12:197–210.
- Zielinski T, Jordan E. 1969. [Remote results of clinical observation of the oncolytic action of adenoviruses on cervix cancer]. *Nowotwory.* 19:217–221.
- Zulkifli MM, Ibrahim R, Ali a M, Aini I, Jaafar H, Hilda SS, Alitheen NB, Abdullah JM. 2009. Newcastle diseases virus strain V4UPM displayed oncolytic ability against experimental human malignant glioma. *Neurol Res.* 31:3–10.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prof. Harvey Cushing (Wikipedia)

Abb. 2: Pilozytisches Astrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 3: Subependymales Riesenzellastrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 4: Pleomorphes Xanthoastrozytom (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 5: Diffuses Astrozytom (WHO Grad II) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 6: Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 7: Gliosarkom (HE) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 8: Gliosarkom (GFAP) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 9: Glioblastom (HE) (Bild selbst angefertigt aus dem Patientenkollektiv der Neuropathologie)

Abb. 10: Demethylierungsschema MGMT

Abb. 11: Morphologie der Gliom Primärkulturen

Abb. 12: Immunzytochemie VZV infizierter MeWo und MRC5 Zellen

Abb. 13: Schematische Darstellung der Virustiterbestimmung

Abb. 14: Infektionsanalyse der Shuttlezellen

Abb. 15: Immunzytochemischer Vergleich der viralen Ausbreitung VZV infizierter Zellkulturen

Abb. 16: Inhibitionsreihe der pOKA VZV Replikation in vitro mittels Aciclovir

Abb. 17: Zytolyse mittels VZV in vitro

Abb. 18: Replikationsgeschwindigkeitsanalyse der VZV Varianten

Abb. 19: VZV Proteinexpression

Abb. 20: Kernmorphologieänderung VZV infizierter Zellen.

Abb. 21: VZV Ausbreitung im 3D Modell

Abb. 22: Dil markierte hMSCs in vitro

Abb. 23: Dil markierte hMSCs im dreidimensionalen Modell

Abb. 24: Morphologieänderung der hMSC Shuttlezellsphäroide nach VZV Infektion

Abb. 25: Migrationseigenschaften der VZV infizierten hMSC Sphäroide in Konfrontation mit anderen Zellsphäroiden

Abb. 26: Immunfluoreszenzanalyse der Migration VZV infizierter hMSC Sphäroide

Abb. 27: Immunzytochemie CD 133 positiv gesorteter Primärkultur- Tumorzellen

Abb. 28: Westernblotanalyse der ASPM Expression verschiedener Primärkulturen.

Abb. 29: Hypothetischer therapeutischer Ansatz für VZV basierte GBM Therapie

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primäre Hirntumore

Tab. 2: Verwendete Zellkulturen

9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle noch einmal recht herzlich bei allen Personen für die Unterstützung und Motivation, dieses Manuskript letztendlich zu finalisieren, bedanken.

Zu Allererst möchte ich meinem ersten Betreuer Dr. Niklas Thon danken, der mit seiner motivierenden und positiv gestimmten Art, sowie dem nötigen Know How zum Verfassen wissenschaftlicher Arbeiten meine Lust zur Forschung geweckt hat. Als nächstes gilt mein Dank Dr. Armin Baiker, der mich immer unterstützt hat und mir auch in schwierigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite stand. Sein biologisches und technisches Wissen, sowie seine antreibende Kraft, haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Daneben erhielt ich auch Unterstützung von Mitarbeitern von Dr. Armin Baikers Gruppe, wie Dr. Maria Vizoso Pinto, Dr. Rudolf Haase und Florian Restle, sowie weiteren Mitarbeitern vom Max von Pettenkofer Institut, wie Dr. Georg Malterer und Dr. Anja Ehrhard, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, wofür ich mich recht herzlich bedanken möchte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich immer ermutigt hat diese Arbeit zu Ende zu bringen. Insbesondere meiner Mutter Heidrun Leske gilt ein ganz besonderer Dank, da sie sich tagtäglich aufopferungsvoll dafür einsetzt, dass ihre Kinder ihre Ziele erreichen können. Vielen Dank!!!

Abschließend gebührt mein großer Dank meiner Ehefrau Sabine Leske, die immer ein offenes Ohr für mich hat, mich in jeder Lebenslage unterstützt und mein Leben bereichert. Außerdem danke ich meiner kleinen Tochter Leonie, die mit ihrer engagierten und problemlösungsorientierten Art ein Vorbild für mich in der Wissenschaft ist, mir gleichzeitig jedoch auch aufzeigt, wie die Prioritäten im Leben zu setzen sind.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Henning Leske, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„*In vitro* Testung des Varizella Zoster Virus als onkolytisches Virus in der Glioblastomtherapie“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Oslo den 20.12.2018

Henning Leske

Unterschrift